

POWERED BY **Dialog**

**Nucleic acid binding oligomers having C-branches for therapy and diagnosis**  
**Nukleinsäure-bindende Oligomere mit C-Verzweigung für Therapie und Diagnostik**  
**Oligomeres liant les acides nucleiques avec branchement en C et leur usage en therapie et diagnostic**

**Assignee:**

BAYER AG, (200140), , 51368 Leverkusen, (DE), (applicant designated states:  
AT;BE;CH;DE;DK;ES;FR;GB;GR;IE;IT;LI;NL;SE)

**Inventor:**

Lobberding, Dr. Antonius, Am Rohm 105, D-42113 Wuppertal, (DE)  
Mielke, Dr. Burkhard, Heisterbachstrasse 4, D-51375 Leverkusen, (DE)  
Schwemler, Dr. Christoph, Am Kloster 59, D-42799 Leichlingen, (DE)  
Schwenner, Dr. Eckhard, Paul-Ehrlich-Strasse 29, D-42113 Wuppertal, (DE)  
Stropp, Dr. Udo, Breidenhofer Strasse 12, D-42781 Haan, (DE)  
Springer, Dr. Wolfgang, Katernberger Schulweg 31, D-42113 Wuppertal, (DE)  
Kretschmer, Dr. Axel, Richard-Zorner-Strasse 32, D-51429 Bergisch Gladbach, (DE)  
Potter, Dr. Thorsten, Roggendorfstrasse 63, D-51061 Koln, (DE)

**Patent**

Country Code/Number	Kind	Date
EP 646596	A1	April 05, 1995 (Basic)
EP 646596	B1	May 26, 1999

**Application**

Country Code/Number	Date
EP 94113573	August 31, 1994

**Priority Application Number (Country Code, Number, Date):** DE 4331011 (930913)

**Designated States:** AT; BE; CH; DE; DK; ES; FR; GB; GR; IE; IT; LI; NL; SE

**International Patent Class:** C07K-005/00; A61K-038/10

**Abstract:** EP 646596 A1 (Translated)

The invention relates to nucleic acid-binding oligomers with C branching of the general formula (I) and to the corresponding monomers, whose radicals have the meaning stated in the description, to the use thereof as pharmaceuticals or as diagnostic aids.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 646 596 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **94113573.3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C07K 5/00, A61K 38/10**

(22) Anmeldetag: **31.08.94**

(30) Priorität: **13.09.93 DE 4331011**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**05.04.95 Patentblatt 95/14**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI NL SE**

(71) Anmelder: **BAYER AG**

**D-51368 Leverkusen (DE)**

(72) Erfinder: **Löbberding, Dr. Antonius**  
**Am Rohm 105**

**D-42113 Wuppertal (DE)**

Erfinder: **Mielke, Dr. Burkhard**

**Heisterbachstrasse 4**

**D-51375 Leverkusen (DE)**

Erfinder: **Schwemler, Dr. Christoph**

**Am Kloster 59**

**D-42799 Leichlingen (DE)**

Erfinder: **Schwenner, Dr. Eckhard**

**Paul-Ehrlich-Strasse 29**

**D-42113 Wuppertal (DE)**

Erfinder: **Stropp, Dr. Udo**

**Breidenhofer Strasse 12**

**D-42781 Haan (DE)**

Erfinder: **Springer, Dr. Wolfgang**

**Katernberger Schulweg 31**

**D-42113 Wuppertal (DE)**

Erfinder: **Kretschmer, Dr. Axel**

**Richard-Zörner-Strasse 32**

**D-51429 Bergisch Gladbach (DE)**

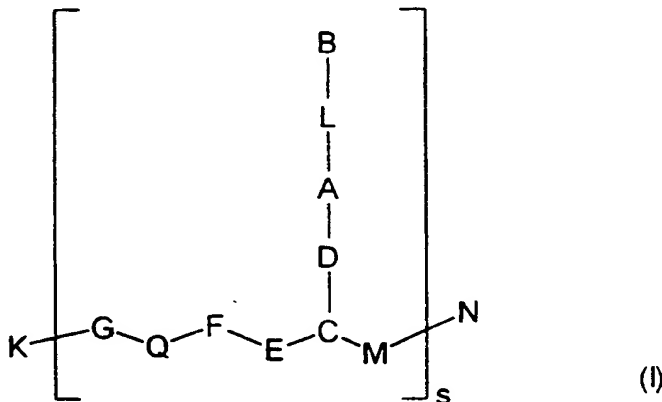
Erfinder: **Pötter, Dr. Thorsten**

**Roggendorfstrasse 63**

**D-51061 Köln (DE)**

(54) **Nukleinsäure-bindende Oligomere mit C-Verzweigung für Therapie und Diagnostik.**

(57) Die Erfindung betrifft Nukleinsäure-bindende Oligomere mit C-Verzweigung der allgemeinen Formel (I)



sowie die entsprechenden Monomere, deren Reste die in der Beschreibung angegebene Bedeutung haben, deren Verwendung als Arzneimittel oder als Hilfsmittel in der Diagnostik.

Das gezielte Abschalten von Genexpression durch komplementäre Nukleinsäuren, sogenannte Antisense-Oligonukleotide, stellt einen neuen Therapieansatz dar. Mögliche Anwendungen reichen von der Behandlung viraler Infektionen bis zur Therapie von Krebs (S. Agrawal, *Tibtech* **10**, 152 (1992); W. James, *Antiviral Chemistry & Chemotherapie* **2**, 191 (1991); B. Calabretta, *Cancer Research* **51**, 4505 (1991)). Die Kontrolle der Genexpression erfolgt auf der Ebene von DNA und RNA und gelingt bereits mit unmodifizierten Oligonukleotiden (C. Helene, *Anti-Cancer Drug Design* **6**, 569 (1991); E. Uhlmann, A. Peyman, *Chemical Reviews* **90**, 543 (1990)). Diese sind jedoch aufgrund mangelnder enzymatischer Stabilität und zu geringer Aufnahme in zelluläre Systeme für therapeutische Anwendungen nicht geeignet. Therapeutische Anwendungen erfordern chemisch modifizierte Antisense-Oligonukleotide.

Oligonukleotide mit modifiziertem Internukleotidphosphat oder einer phosphatfreien Internukleotidverknüpfung wurden in vielen Arbeiten systematisch untersucht; ihre Synthese erwies sich jedoch als sehr aufwendig und beobachtete therapeutische Effekte als nicht ausreichend (E. Uhlmann, A. Peyman, *Chemical Reviews* **90**, 543 (1990)).

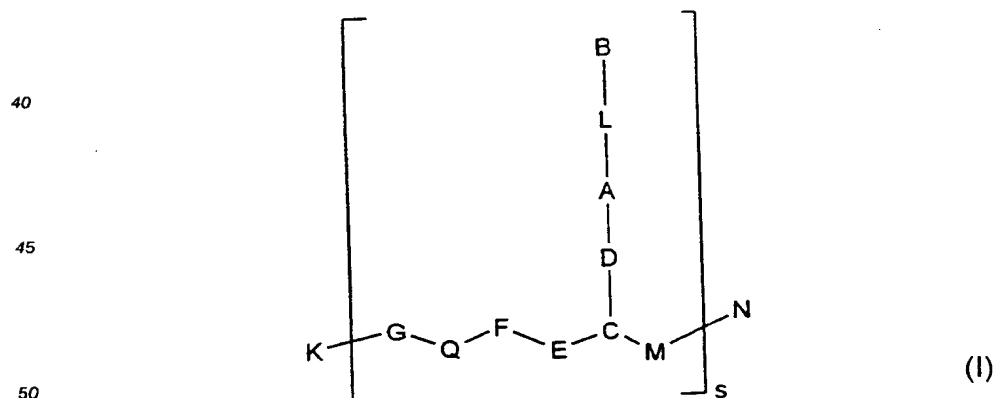
Eine Alternative zur Modifikation oder Substitution der Phosphatgruppe in Nukleinsäuren ist der komplette Austausch von Ribose und Phosphat durch ein anderes Rückgrat. Dieses Konzept wurde erstmals von Pitha et al. realisiert, der Ribosephosphat durch Poly-N-Vinyl-Derivate ersetzte, was zu sogenannter "Plastik-DNA" führt (J. Pitha, P.O.P. Ts'O, *J. Org. Chem.* **33** 1341 (1968); J. Pitha, *Adv. Polym. Sci.* **50**, 1 (1983)). Es erlaubt jedoch nicht den gezielten Aufbau definierter Sequenzen.

Die Synthese definierter Sequenzen gelingt, wenn anstelle von Zuckerphosphat beispielsweise ein Polyamid-Rückgrat verwendet wird, das in Analogie zur konventionellen Peptidsynthese (M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin, 1984) schrittweise aufgebaut wird. Dieses Konzept wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bearbeitet (B.V. Tyaglov, V.I. Permogorov, N.A. Chernykh, Yu. A. Semiletov, K. Konde, Yu.P. Shvachkin, *Zh. Obshch. Khim.* **57**, 1393 (1987); J.E. Summerton et al. *WO 86 05518* H.S. Varma et al. *WO 92/18518*; O. Buchardt et al. *WO 92/20702*; H. Wang, D.D. Weller, *Tetrahedron Letters* **32**, 7385 (1991); P. Garner, J.U. Yoo, *Tetrahedron Letters* **34**, 1275 (1993); S.-B. Huang, J.S. Nelson, D.D. Weller, *J. Org. Chem.* **56**, 6007 (1991); H. De Koning, U.K. Pandit, *Rec. Trav. Chim.* **91** 1069 (1971); A.B. Cheikh, L.E. Orgel, *J. Mol. Evol.*, **30**, 315 (1990)).

Polyamid-Nukleinsäuren eignen sich ebenfalls für diagnostische und molekularbiologische Anwendungen (Buchardt et al. *WO 92/20703*).

Wir haben neue Nukleinsäuren-bindende Oligomere mit einer C-Verzweigung synthetisiert und für diese wurde eine überraschend gute Bindung an DNA und RNA gefunden. Die Substanzen eignen sich zur Kontrolle von Genexpression und zeigen antivirale Eigenschaften. Weiterhin lassen sich derartige Substanzen in Diagnostik und Molekularbiologie zur Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren verwenden.

Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



in der

55 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,

B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch

chemische Modifikation von diesen abgeleitete Derivate sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 5 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 E für -NH-, -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,  
 A und E miteinander über eine Alkylkette [-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,  
 F für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub>- mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe  
 10 bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus:  
 Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,  
 15 G und Q miteinander über eine Alkylkette [-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können  
 20 G für -NH-, -NR-, -O-, -S- steht,  
 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 L für (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,  
 K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,  
 N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht und  
 25 s für einen Wert von 1 bis 30 steht.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

- R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, iso-Butyl oder tert.-Butyl sein kann), Aralkyl (wobei Aralkyl = Benzyl,  $\alpha$ -Naphthylmethyl oder  $\beta$ -Naphthylmethyl sein kann) oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, 2-Pyridyl oder 4-Pyridyl gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO<sub>2</sub> sein kann).  
 30 Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,  
 35 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 40 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,  
 A und E miteinander über eine Alkylkette [-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,  
 F für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub>- mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe  
 45 bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus:  
 Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,  
 50 G und Q miteinander über eine Alkylkette [-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können  
 G für -NH-, -NR-, -O- steht,  
 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -CS- steht,  
 55 L für (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,  
 K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,  
 N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,  
 s für einen Wert von 1 bis 30 steht,

5      gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder  $\text{NO}_2$  sein kann;  
 Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

in der

- 10

E für -NR-, -NH-, -CHR- steht,  
A und E miteinander über eine Alkylkette  $[-(\text{CH}_2)_n]$ , mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können,

- 20

25 G und Q miteinander über eine Alkylkette  $[(-CH_2)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können

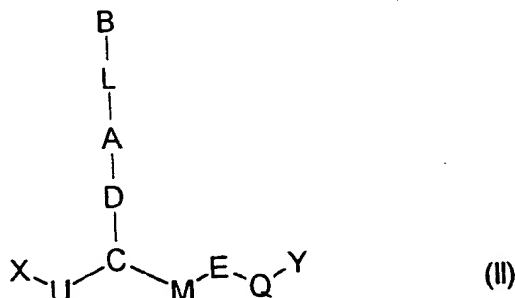
- 30

Allgemeine Definition der Reste  $R$  und  $R'$ :

Allgemeine Definition der Reste R und R':  
R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Methyl oder Benzyl.

### Monomere- und Dipeptid-Bausteine für Peptid-Nukleinsäuren

Die Erfindung betrifft weiterhin Verbindungen der allgemeinen Formel (II)



in der

- 55 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,  
B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische

Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen.

- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 5 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 E für -NH-, -NR-, CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,  
 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin,  
 10 Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,  
 15 E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können  
 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 L für (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,  
 20 U für -NH-, -NR-,  
 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form und  
 Y für COOH, CSOH, CH<sub>2</sub>OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.

25 Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, iso-Butyl oder tert.-Butyl sein kann), Aralkyl (wobei Aralkyl = Benzyl,  $\alpha$ -Naphthylmethyl oder  $\beta$ -Naphthylmethyl sein kann) oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, 2-Pyridyl oder 4-Pyridyl gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO<sub>2</sub> sein kann).

30 Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,  
 35 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 40 E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,  
 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin,  
 45 Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,  
 E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können  
 50 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 L für (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,  
 U für -NH-, -NR-,  
 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form und  
 55 Y für COOH, CSOH, CH<sub>2</sub>OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei

Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl oder n-Butyl, sein kann), Benzyl oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder NO<sub>2</sub> sein kann).

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

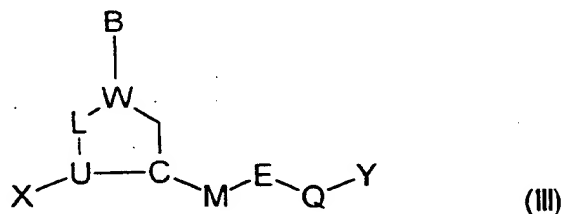
in der

- 5 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der  
 10 Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,  
 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 E für -NR-, -NH-, -CHR-, -O- steht,  
 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe  
 15 bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro-α-aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,  
 20 E und Q miteinander über eine Alkylkette [-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können  
 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -CS- steht,  
 L für (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,  
 U für -NH-, -NR-,  
 25 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form und  
 Y für COOH, CSOH, CH<sub>2</sub>OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

- 30 R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Methyl oder Benzyl.

Die Erfindung betrifft auch Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



45 in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische  
 50 Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,  
 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 55 E für -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,  
 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histi-



din, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette  $[(-CH_2-)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können

M für  $-CH_2-$ ,  $-CO-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO-$ ,  $-CS-$  steht,

U für  $-NH-$ ,  $-NR-$  steht,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,

Y für  $COOH$ ,  $CSOH$ ,  $CH_2OH$ ,  $COOR''$  mit  $R'' =$  beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl, iso-Propyl, n-Butyl, iso-Butyl oder tert.-Butyl sein kann), Aralkyl (wobei Aralkyl = Benzyl,  $\alpha$ -Naphthylmethyl oder  $\beta$ -Naphthylmethyl sein kann) oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, 2-Pyridyl oder 4-Pyridyl gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder  $NO_2$  sein kann).

Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (III)

in der

A für  $-CO-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:  $-H$ ,  $-OH$ ,  $(C_1-C_4)$ -Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

C für  $-CH-$ ,  $-CR-$  steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für  $-NH-$ ,  $-CH_2-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

E für  $-NR-$ ,  $-NH-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$ ,  $-O-$  steht,

Q für  $(-CR^1R^2-)_m$  mit  $m = 0, 1, 2$  und  $R^1, R^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette  $[(-CH_2-)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können

M für  $-CH_2-$ ,  $-CO-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO-$ ,  $-CS-$  steht,

U für  $-NH-$ ,  $-NR-$ ,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,

Y für  $COOH$ ,  $CSOH$ ,  $CH_2OH$ ,  $COOR''$  mit  $R'' =$  beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann.

Allgemeine Definition der Reste R und R':

R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Alkyl (wobei Alkyl = Methyl, Ethyl, n-Propyl oder n-Butyl, sein kann), Benzyl oder Aryl (wobei Aryl = Phenyl, gegebenenfalls substituiert mit Methyl, Halogen oder  $NO_2$  sein kann).

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (III)

in der

A für  $-CO-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:  $-H$ ,  $-OH$ ,  $(C_1-C_4)$ -Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der

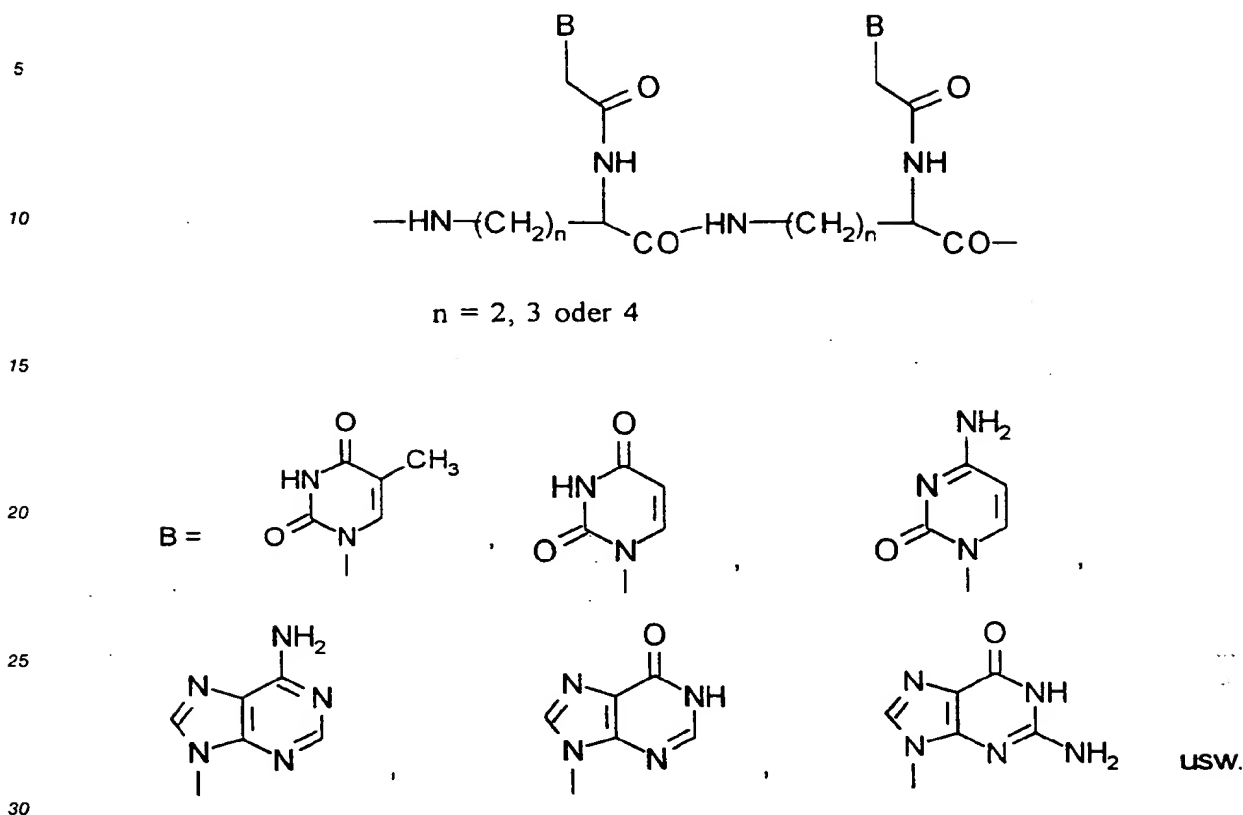
- Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,
- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,
- D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,
- E für -NR-, -NH-, -CHR-, -O- steht,
- 5 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,
- 10 E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können
- M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -CS- steht,
- U für -NH-, -NR-,
- 15 X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,
- Y für COOH, CSOH, CH<sub>2</sub>OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,
- W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann.
- 20 Allgemeine Definition der Reste R und R':  
R und R' können unabhängig voneinander aus folgender Gruppe ausgewählt werden: H, OH, Methyl oder Benzyl.
- Mit Carrier-System oder Reporter-Ligand ist gemeint ein zellspezifisches Bindungs- und Erkennungs-Agens, das spezifisch an die Zelloberfläche bindet und das die Internalisierung der der Erfindung zugrunde liegenden Nukleinsäure-bindenden Oligomeren bewirkt. Die Internalisierung kann auf verschiedenem Wege, z.B. durch Endocytose oder aktive Transportmechanismen erfolgen.
- 25 Die Struktur der Zelloberfläche kann ein Protein, Polypeptid, Kohlenhydrat, Lipid oder eine Kombination daraus sein. Typischerweise wird die Zellaufnahme durch Oberflächenrezeptoren bewirkt. Deshalb kann das Bindungs- und Erkennungs-Agens ein natürlicher oder synthetischer Ligand eines Rezeptors sein.
- 30 Der Ligand kann ein Protein, Polypeptid, Kohlenhydrat, Lipid oder eine Kombination von diesen sein, ausgestattet mit funktionellen Gruppen, die so angeordnet sind, daß sie durch die Zelloberflächen-Struktur erkannt werden können. Es kann sich auch um eine Komponente oder die Gesamtheit eines biologischen Organismus handeln, z.B. eines Virus, einer Zelle oder um artifizielle Transportsysteme, wie z.B. Liposomen. Es kann sich weiterhin um einen Antikörper oder ein Analogon eines Antikörpers handeln.
- 35 Für die Adressierung an unterschiedliche Zellen müssen verschiedene Liganden eingesetzt werden.
- Als Liganden für die Adressierung an Makrophagen kommen bevorzugt Kohlenhydrate, wie z.B. Mannose, Polykationen, wie z.B. Polylysine, Polyarginine, Polyornithine, basische Proteine, wie z.B. Avidin, sowie Glycopeptide, Peptide oder Lipopeptide in Frage (G.Y. Chu et al., WO 9304701).
- 40 Mit löslichkeitsvermittelnden Gruppen sind funktionelle Gruppen gemeint, die die Löslichkeit in Wasser vermitteln. Dabei kann es sich z.B. um Ester oder Amide von Aminosäuren, Hydroxycarbonsäuren, Aminosulfonsäuren, Hydroxysulfonsäuren oder Diaminen handeln. Bevorzugt sind Amide von Diaminocarbonsäure, wie Ornithin, Lysin oder 2,4-Diaminobuttersäure.

45

50

55

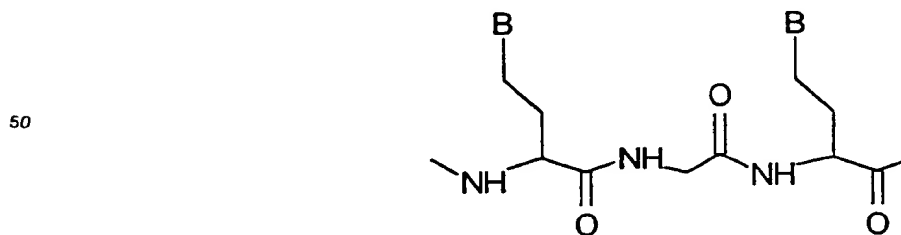
# Peptid-Nukleinsäuren mit $\alpha,\omega$ -Diaminocarbonsäure-Backbone



Bei den Verbindungen dieses Typs ist das Zuckerphosphat-Rückgrat der natürlichen Nukleinsäuren durch ein über die Seitenketten verknüpft Polymeres aus  $\alpha,\omega$ -Diaminocarbonsäuren, wie z.B. Lysin, Ornithin oder 2,4-Diaminobuttersäure ersetzt. Die Nukleobasen sind über Acyl-Spacer an die  $\alpha$ -Aminogruppen gebunden. Es resultieren relativ flexible Oligomere.

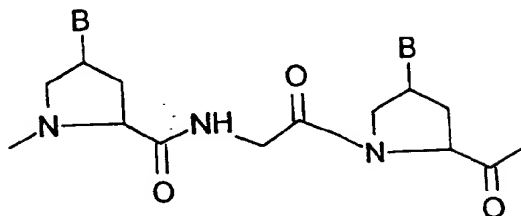
## Peptid-Nukleinsäuren mit 2-Aminobutyrylglycin-Backbone

Bei den Verbindungen dieses Typs ist das Ribosephosphat- bzw. Desoxyribosephosphat-Backbone von RNA bzw. DNA durch ein Peptidbackbone aus 2-Aminobutyrylglycin-Dipeptiden ersetzt. Das resultierende Oligomere zeichnet sich durch seine hohe Flexibilität aus. Durch den Kettenaufbau mit chiralen  $\alpha$ -Aminosäuren wird zudem die Variationsbreite (Änderung der Chiralität, Verwendung anderer Spacer anstelle von Glycin) bei der Oligomerensynthese enorm erhöht.



(B ist definiert wie oben)

# Peptid-Nukleinsäuren mit Pyrrolidin-2-carboxyglycin-Backbone



(B ist definiert wie oben)

Bei diesem Strukturtyp ist das Zuckerphosphat-Backbone der natürlichen Nukleinsäuren durch ein Peptidbackbone aus Pyrrolidin-2-carboxyglycin-Dipeptiden ersetzt. Durch den Einsatz von Pyrrolidin-2-carbonsäure im Backbone erhält man rigide Strukturen. Durch Variation der Chiralitätszentren an der Pyrrolidin-2-carbonsäure erhält man Oligomere mit unterschiedlicher Konformation. Außerdem erlaubt auch dieser Ansatz das Ersetzen des Glycinspacers durch andere Spacer wie z.B. andere Aminosäuren oder Hydroxycarbonsäuren..

## Biologische Eigenschaften bzw. Wirkungen dieser Verbindungen

### Stabilität gegenüber Proteasen und Nukleasen

Neben der Kettenlänge, der Sequenz und der Zellpermeabilität spielt die Protease- und Nukleaseresistenz eine wichtige Rolle für die biologische Wirkung von Nukleinsäure-bindenden Oligomeren.

Die synthetisierten Oligomeren wurden deshalb in Bezug auf ihre Protease- und Nukleasestabilität mit natürlichen Oligonukleotiddiestern verglichen.

Die Nukleinsäure bindenden Oligomere wurden hierzu mit unspezifischen und spezifischen Proteasen wie z.B. Pronase E, Proteinase K, Trypsin, Endoprotease Lys-C, V8 Protease, Protease IX, Protease XXI, und Nukleasen wie z.B. S1 Nuklease, Bal31 Nuklease, Phosphodiesterase sowie Zellextrakte, Organextrakte, Blutserum und Blutextrakte, die verschiedene Nukleasen und Proteasen enthalten, behandelt. Durch Polyacrylamidgelelektrophorese und UV-Shadowing auf DC-Platten mit UV-Indikator sowie durch Silberanfärbung der Polyacrylamidgele wurden die Oligomeren auf Degradation überprüft.

Natürliche Oligonukleotid-Diester weisen eine nur geringe Nukleasestabilität auf. Sie werden innerhalb von 30 Minuten bis zu 1 Stunde vollständig degradiert.

Nukleinsäure-bindende Oligomere mit C-Verzweigung sind dagegen vollständig resistent gegenüber Nukleasen und Proteasen und eignen sich deshalb besonders gut für den Einsatz als Inhibitoren mit Antisense Wirkung.

### DNA-Einzelstrangbindung durch Gel-Shift-Analysen

Die hier beschriebenen Nukleinsäure-bindenden Oligomeren wurden in Gel-Shift-Analysen untersucht. Bei diesen Band-Shift-Experimenten wurde das geänderte Laufverhalten von radioaktiv-markierten Oligonukleotiden nach Hybridisierung mit den hier beschriebenen Oligomeren in einer Polyacrylamidgelelektrophorese gemessen. Die hybridisierten Oligonukleotide wandern in der Elektrophorese langsamer, weil sich durch die Hybridbildung erstens das Molekulargewicht vergrößert und zweitens sich die Ladung pro Masseinheit im Hybridkomplex verringert. Im Vergleich zu einem nicht hybridisierten Oligonukleotid kommt es im Gel zu einem verzögerten Laufverhalten (Gel-Retardation).

### Strangverdrängung in doppelsträngiger Plasmid-DNA

Nukleinsäure-bindende Oligomere sind biologisch aktiv, indem sie sequenzselektiv die Bindung durch Strangverdrängung an doppelsträngige DNA (dsDNA) zeigen. Diese Wirkung von Nukleinsäure-bindenden Oligomeren läßt sich sequenzabhängig und konzentrationsabhängig in in-vitro Tests nachweisen.

## Inhibition der Genexpression (In-vitro-Translationstest)

Nukleinsäure-bindende Oligomere, die in Gel-Shift- und Strangverdrängungs-Experimenten aufgefallen sind, wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Proteinsynthese spezifischer Gene zu inhibieren. Voraussetzung dafür ist, daß in dem betreffenden Gen die entsprechende Sequenz des Nukleinsäure-bindenden Oligomeren in paralleler oder antiparalleler Basensequenz enthalten ist. Es hatte sich bei den in vitro Translationen gezeigt, daß die hier beschriebenen Nukleinsäure-bindenden Oligomeren sehr potente, sequenzspezifische Inhibitoren für Genexpressionen sind. Dabei waren kürzere Sequenzen und geringere Konzentrationen als bei sequenzgleichen Oligonukleotiden ausreichend für bessere Hemmungen.

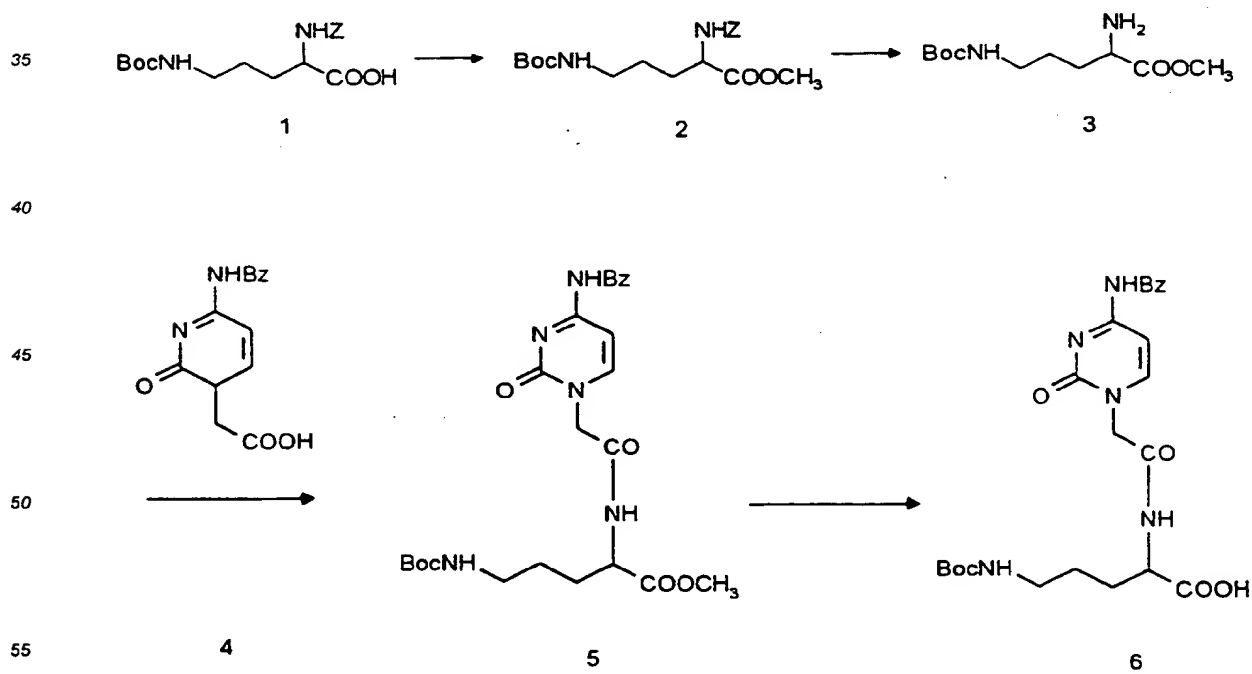
Die Zielsequenz kann aus dem Promotor eines krankheitsauslösenden Gens stammen. Insbesondere Enhancer- oder Transkriptionsfaktoren und DNA- oder RNA-Polymerase bindende Zielsequenzen aus Genen von Viren, Bakterien, Pilzen, Endoparasiten, Oncogenen oder Genen, die an der Ausprägung von Entzündungserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, oder Herz-Kreislaufkrankungen wie Bluthochdruck oder Arteriosklerose beteiligt sind, sind hier als mögliche Zielsequenzen für die therapeutische Anwendung von Nukleinsäuren-bindenden Oligomeren zu nennen.

Die entsprechenden pharmazeutischen Zubereitungen enthalten neben Oligomeren mit C-Verzweigung die für parenterale Zubereitungen üblichen Hilfsstoffe wie z.B. Puffer und/oder Stabilisatoren oder Liposomenformulierungen. Ferner ist eine topische Anwendung denkbar. Die hierfür einsetzbaren Zubereitungen sind z.B. Salben, Cremes, Lösungen oder Pflaster, die neben dem Wirkstoff die für diese Anwendung geeigneten pharmazeutischen Hilfsstoffe enthalten.

Therapeutisch wirksame Nukleinsäuren bindende Oligomere, wie sie hier beschrieben sind, können nicht nur wie oben erwähnt die Genexpression durch die sequenz-selektive Bindung an mRNA hemmen, sondern natürlich auch aufgrund ihrer Eigenschaft doppelsträngige DNA zu verdrängen, die Promotor- und Enhancersequenzen von zu hemmenden Genen sequenz-selektiv inaktivieren.

Nukleinsäuren-bindende Oligomere enthalten für diese Anwendung der Gen-Inaktivierung nicht nur Nukleotidasensequenzen von (-)-Strang DNA sondern durchaus auch die (+)-Strang DNA Sequenz der zu hemmenden Ziel-DNA.

## 5. Synthese von monomeren Bausteinen

5.1 Monomere für Peptid-Nukleinsäuren mit  $\alpha,\omega$ -Diaminocarbonsäure-Backbone

Die Synthese der Monomeren für Peptid-Nukleinsäuren mit  $\alpha,\omega$ -Diaminocarbonsäure-Backbone sei am Beispiel des Cytosin-Ornithin-Derivates 6 erläutert:

$\alpha$ -N-(Benzyloxycarbonyl)- $\delta$ -N-(tert.-butoxycarbonyl)-L-ornithin 1 wird mit Methyljodid und Cäsiumcarbonat in den Methylester 2 überführt. Die  $\alpha$ -N-Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird hydrogenolytisch entfernt. Das Derivat 3 mit freier  $\alpha$ -Aminogruppe wird in Gegenwart eines Kondensationsmittels, z.B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, mit N<sup>4</sup>-Benzoyl-1-carboxymethyl-cytosin 4 zur Reaktion gebracht. Dabei resultiert 5. Alternativ ist die Verknüpfung auch unter Verwendung von Aktivestern, z.B. Pentafluorphenylestern der 1-Carboxymethylnukleobasen möglich.

Der Methylester in 5 wird in Gegenwart einer Base verseift. Die Benzoat-Schutzgruppe wird nicht angegriffen.

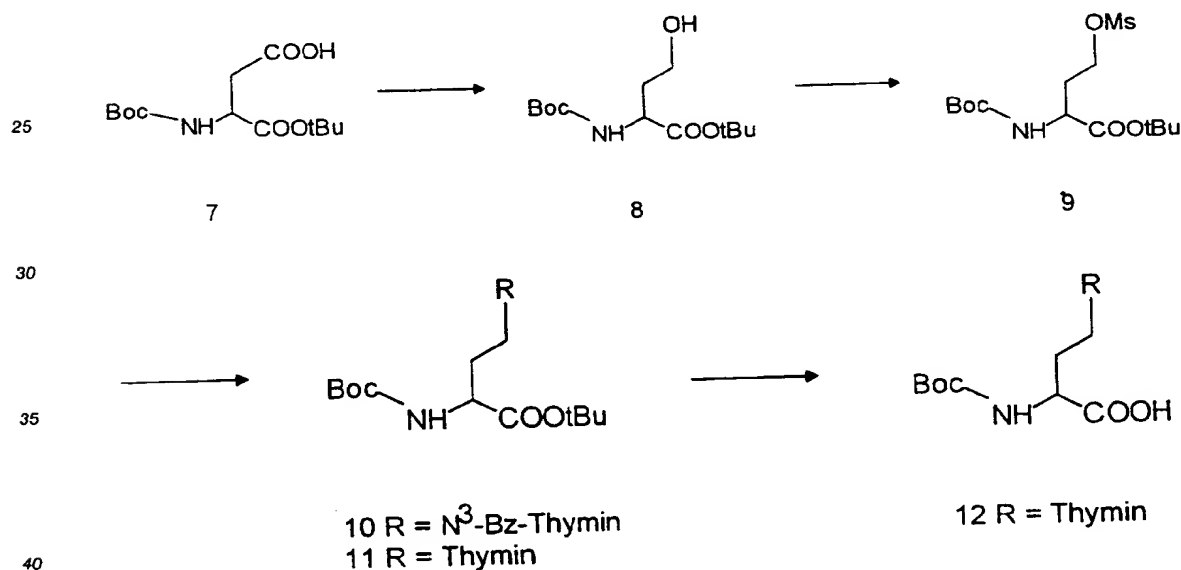
Die Peptid-Nukleinsäure 6 ist für den Einsatz in der Festphasen-Peptidsynthese unter "Boc-Bedingungen" geeignet.

Derivate anderer Nukleobasen und anderer  $\alpha,\omega$ -Diaminocarbonsäuren, wie z.B. Lysin und 2,4-Dianiinobuttersäure sind analog zugänglich. Außerdem können anstelle der L-Aminosäurederivate auch die D-Aminosäurederivate eingesetzt werden.

## 5.2 Monomere für Peptid-Nukleinsäuren mit 2-Aminobutyryl-glycin-Backbone

Als Beispiel für die Monomerensynthese wird der Thyminbaustein angeführt:

20



30

35

40

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure wird in einem aprotischen dipolaren Lösungsmittel mit einem komplexen Hydrid zu N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-Homoserin-tert.-butylester 8 reduziert (außer der L-Asparaginsäure läßt sich die Synthese auch mit D-Asparaginsäure durchführen). Die Hydroxylgruppe wird in eine Abgangsgruppe überführt (z.B. zu 9) und gegen eine heterocyclische Nukleobase (z.B. 10) substituiert. Anschließend werden die Schutzgruppen abgespalten und die  $\alpha$ -Aminofunktion geschützt (z.B. 12). Das 2-Aminobutyryl-glycin-Backbone erhält man bei der Oligomerisierung dadurch, daß alternierend der 2-Aminobutyryl-Baustein und ein Glycin-Baustein verwendet werden.

Andere Backbone-Typen erhält man ganz einfach durch Verwendung anderer Spacer anstelle des Glycins bei der Oligomerisierung.

## 5.3 Monomere für Peptid-Nukleinsäuren mit Pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-Backbone

Als Beispiel für die Monomerensynthese wird der Thyminbaustein aufgeführt:  
Ein N- und C-terminal geschützter Hydroxyprolin-Baustein (z.B. 13 oder 14) wird in einem aprotischen Lösungsmittel in einer Mitsunobu Reaktion mit einer Nukleobase umgesetzt, wobei z.B. 15 oder 16 erhalten wird. Anschließend wird der Ester gespalten und bei 15 oder 16 zusätzlich die Nukleobase entschützt, so

daß man 17 erhält. Ausgehend vom L-trans-Hydroxyprolinderivat 14 erhält man dabei das L-cis-Pyrrolidin-2-carbonsäureprodukt 17. Um in die Reihe der L-trans-Pyrrolidin-2-carbonsäureprodukte zu gelangen benötigt man L-cis-Hydroxyprolinderivate, welche man durch Chiralitätsumkehr in der 4-Position aus den L-trans-Hydroxyprolinderivaten erhält (z.B. auf dem Weg von 14 in einer Mitsunobu Reaktion über 18 nach 19). Der weitere Syntheseweg zu 21 erfolgt dann analog zu den Umsetzungen von 14 nach 17. Außer den L-cis- und den L-trans-Produkten lassen sich auch die D-cis und die D-trans Produkte herstellen.

Andere Backbonetypen erhält man durch Verwendung anderer Spacer anstelle des Glycins bei der Oligomerisierung.

10

15

20

25

30

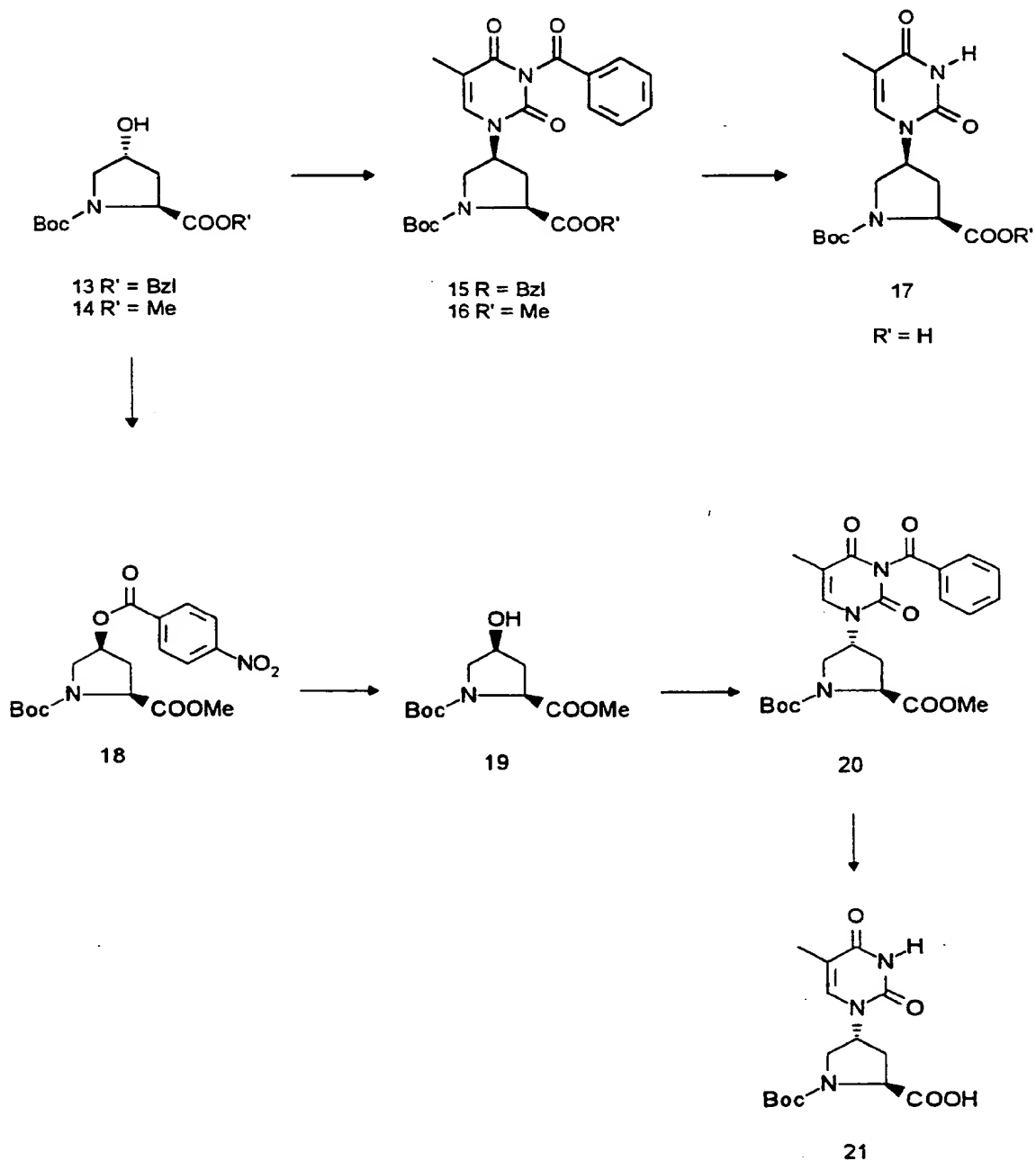
35

40

45

50

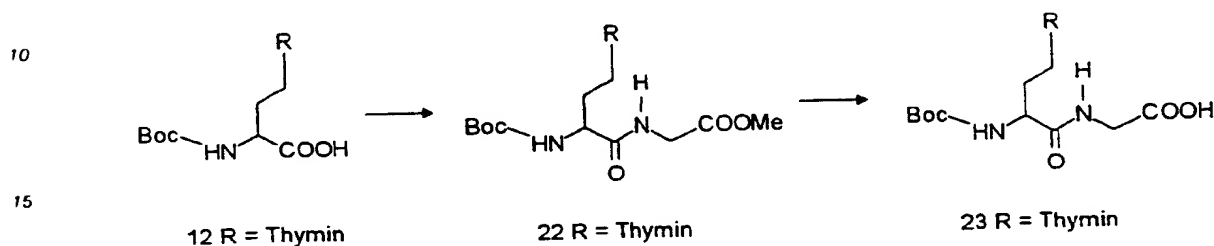
55



### Dipeptidbausteine für Peptid-Nukleinsäuren mit 2-Aminobutyryl-glycin-Backbone

Zur Synthese der Dipeptide wird z.B. N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure 12 mit Glycinmethylester in Gegenwart von EDCI<sup>+</sup>HCl und HOBT<sup>+</sup>H<sub>2</sub>O zu 22 gekuppelt. Anschließend wird der Ester verseift, was zur Verbindung 23 führt.

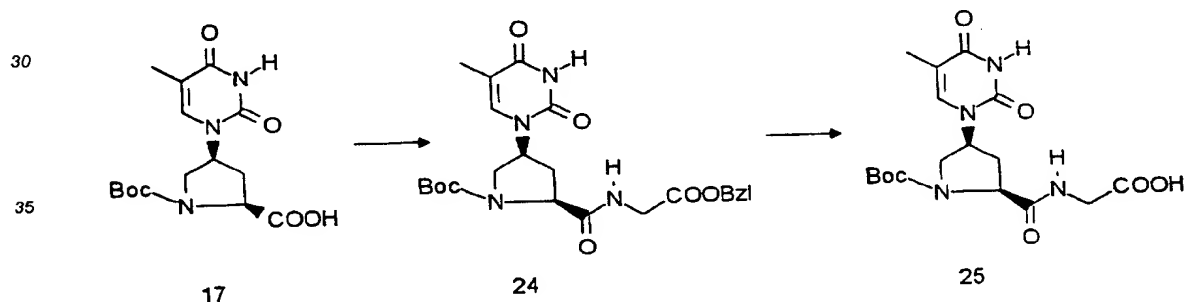
Außer Glycin lassen sich auf vergleichbarem Weg auch andere natürliche oder unnatürliche Aminosäuren ankuppeln. Die erhaltenen Dipeptide dienen dann zur Oligomerisierung.



### 20 Dipeptidbausteine für Peptid-Nukleinsäuren mit Pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-Backbone

Zur Synthese der Dipeptide wird z.B. 2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)pyrrolidin-2-carbonsäure 17 mit Glycinmethylester in Gegenwart von EDCI<sup>+</sup>HCl und HOBT<sup>+</sup>H<sub>2</sub>O zu 24 gekuppelt. Anschließend wird der Ester verseift, was zur Verbindung 25 führt.

Außer Glycin lassen sich auf vergleichbarem Weg auch andere natürliche oder unnatürliche Aminosäuren ankuppeln. Die erhaltenen Dipeptide dienen dann zur Oligomerisierung.

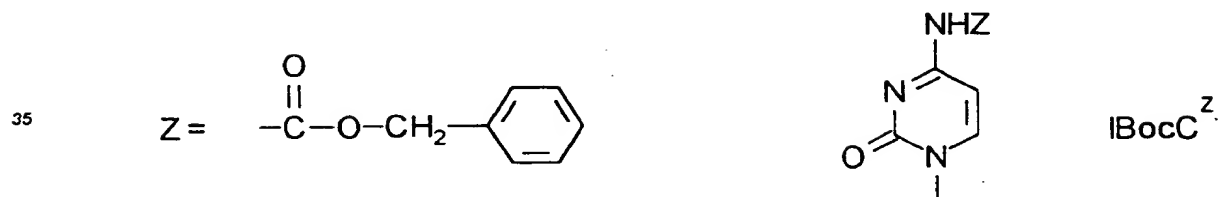
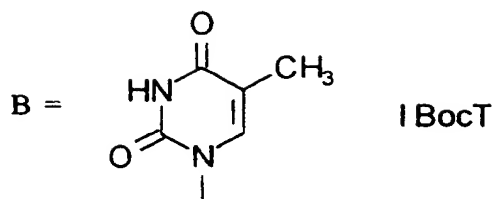
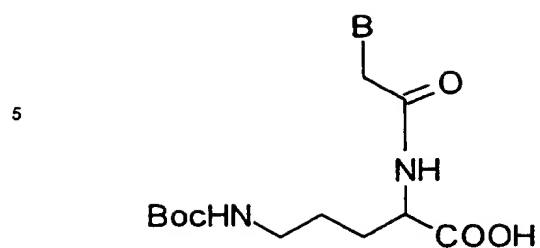


### Oligomeren-Synthesen

Die Verknüpfung der Bausteine zu Oligomeren erfolgt durch Festphasenpeptidsynthese. Als polymere Träger wurden PAM-, MBHA- oder HMP-Resins der Firma Applied Biosystems eingesetzt. Die Bausteine werden in Analogie zur konventionellen Peptidsynthese entweder nach dem Fmoc- oder Boc-Verfahren verknüpft. Die Aktivierung der Bausteine erfolgt in N-Methyl-2-pyrrolidon durch Umsetzung mit Hydroxybenzotriazol/Dicyclohexylcarbodiimide oder Pentafluorphenol/Dicyclohexylcarbodiimid. Die Sequenzen werden im Anschluß durch Behandlung mit HF oder Trifluormethansulfonsäure (Boc-Methode, PAM- oder MBHA-Resin) oder durch Trifluoressigsäure (Fmoc-Methode, HMP-Resin) abgespalten. Die Reaktionsprodukte werden durch präparative HPLC an RP 8 mit einem ansteigenden Gradienten von Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser isoliert. Nach dieser Methode wurden Sequenzen mit Kettenlängen bis 15 Bausteinen synthetisiert.

Zur Oligomerisierung wurden vorzugsweise nachfolgend aufgeführte  $\alpha,\omega$ -Diaminocarbonsäure-Bausteine eingesetzt. Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden.

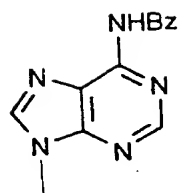




50

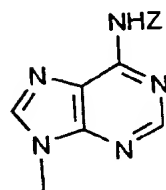
55

5



BocA<sup>Bz</sup>

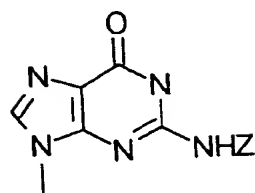
10



IBocA<sup>Z</sup>

15

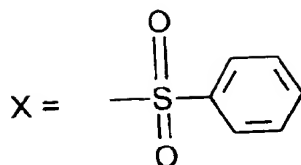
20



IBocG<sup>Z</sup>

25

30



35

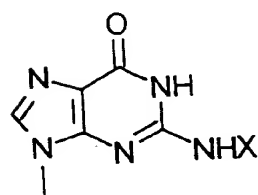
Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

40

45

50

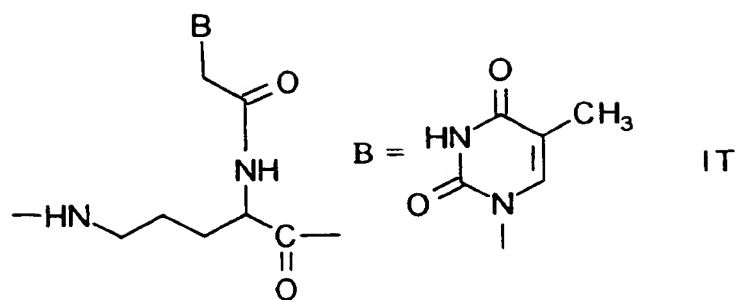
55



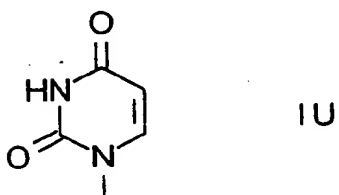
IBocG<sup>X</sup>

5

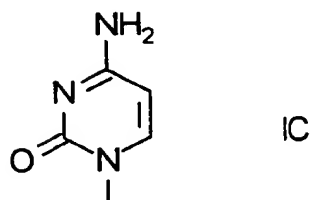
10



15

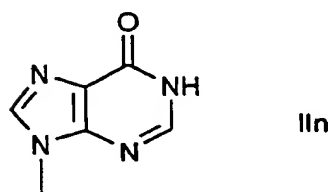


20



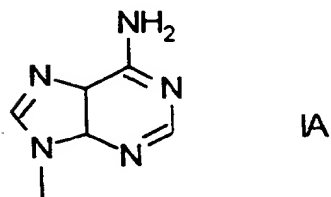
25

30

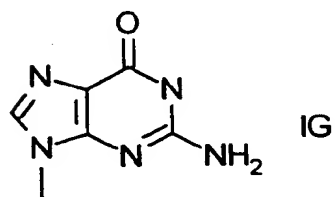


35

40



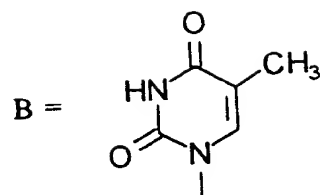
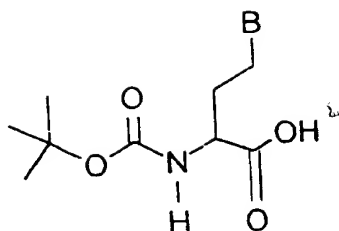
45



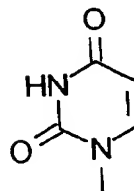
50

Zur Oligomerisierung wurden vorzugsweise nachfolgend aufgeführte 2-Aminobutyryl-Bausteine eingesetzt.  
Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden:

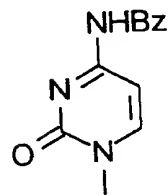
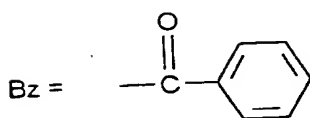
55



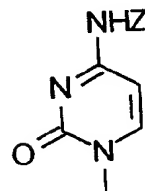
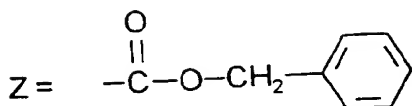
|| BocT



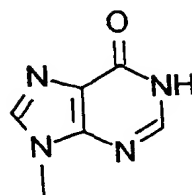
|| BocU



|| BocC<sup>Bz</sup>

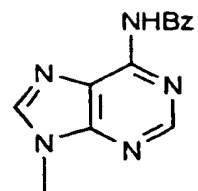


|| BocC<sup>Z</sup>



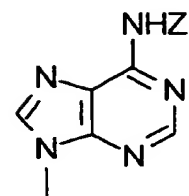
|| BocIn

5



II BocA<sup>Bz</sup>

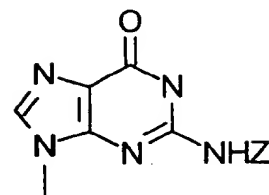
10



II BocA<sup>Z</sup>

15

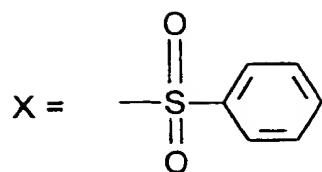
20



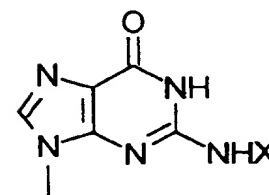
II BocG<sup>Z</sup>

25

30



35



II BocG<sup>X</sup>

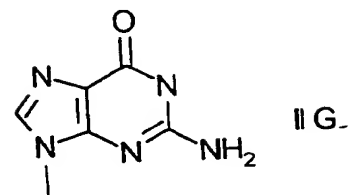
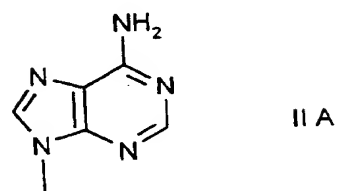
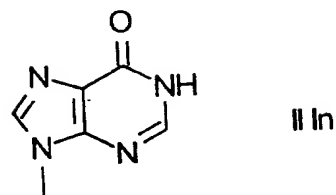
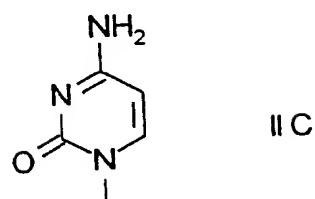
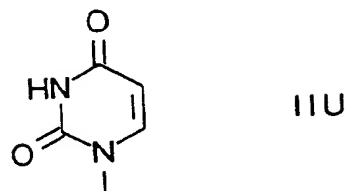
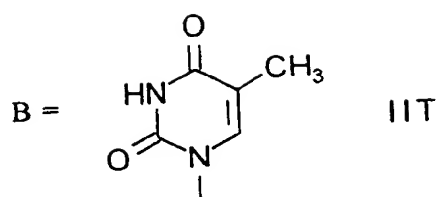
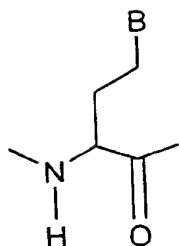
Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

40

45

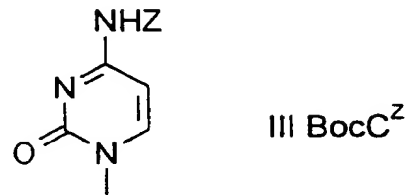
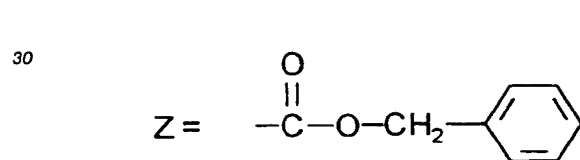
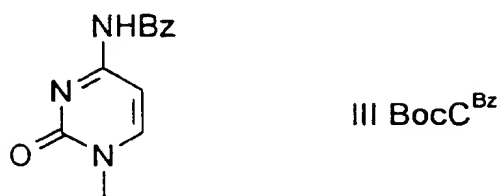
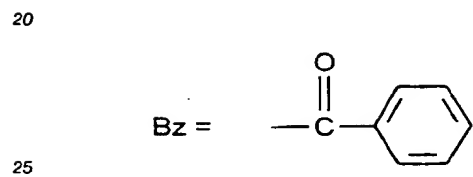
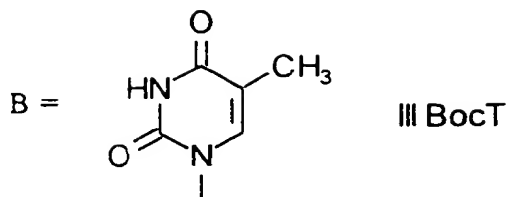
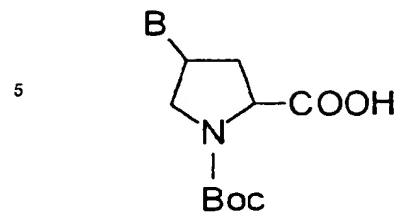
50

55



50 Zur Oligomerisierung wurden vorzugsweise nachfolgend aufgeführte Pyrrrolidon-2-carboxyl-Bausteine eingesetzt. Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden:

55

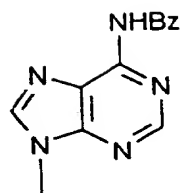


III BocIn

50

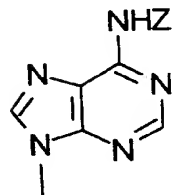
55

5



III BocA<sup>Bz</sup>

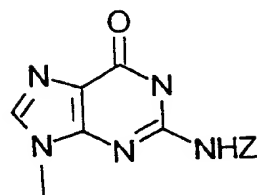
10



III BocA<sup>Z</sup>

15

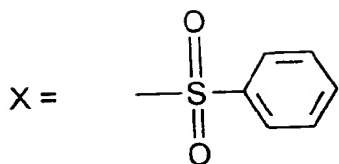
20



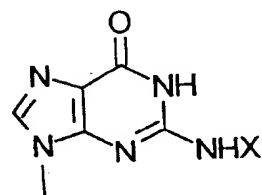
III BocG<sup>Z</sup>

25

30



35



III BocG<sup>X</sup>

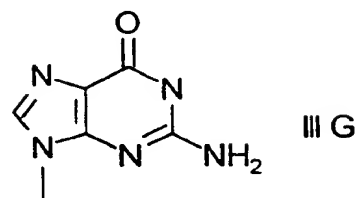
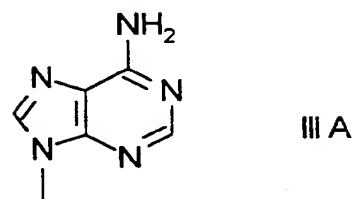
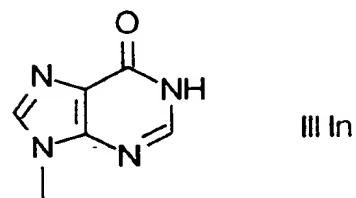
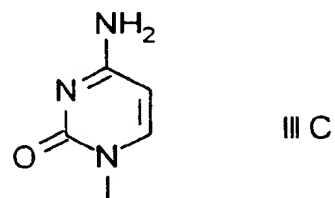
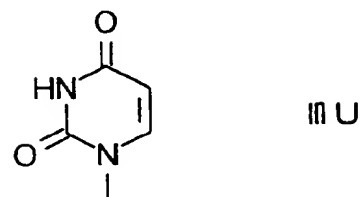
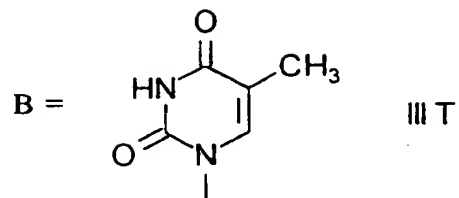
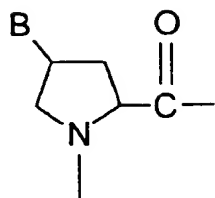
40 Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

45

50

55





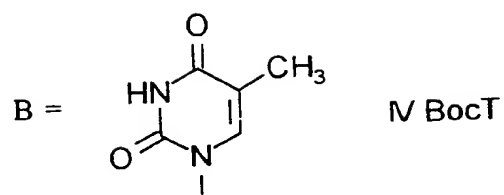
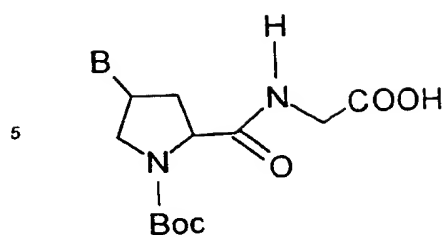
40

45

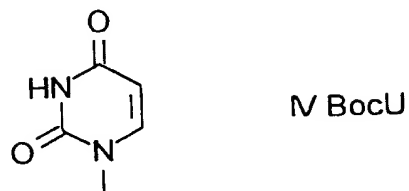
50

Zur Oligomerisierung wurden ebenfalls nachfolgend aufgeführte dimere Bausteine eingesetzt. Alternativ zur Boc-Schutzgruppe kann ebenfalls die Fmoc-Schutzgruppe eingesetzt werden:

55



10



15

20



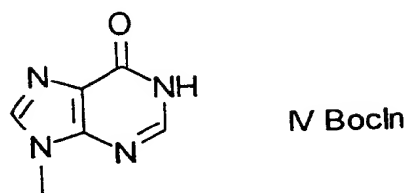
25

30



35

40

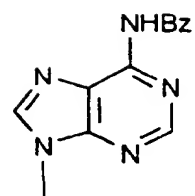


45

50

55

5



IV BocA<sup>Bz</sup>

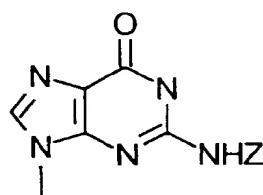
10



IV BocA<sup>z</sup>

15

20

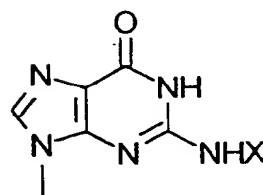
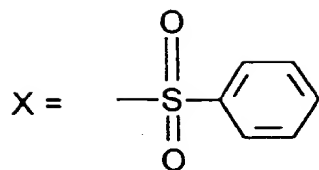


IV BocG<sup>z</sup>

25

30

35



IV BocG<sup>x</sup>

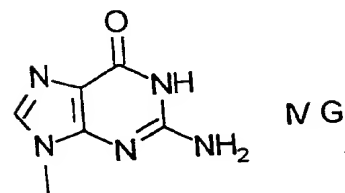
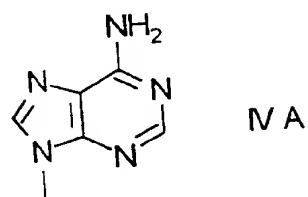
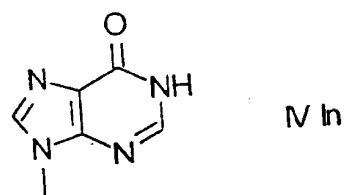
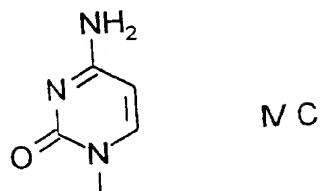
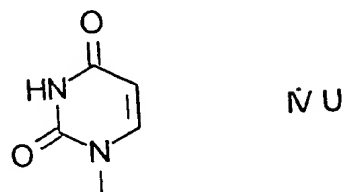
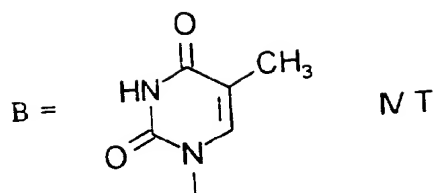
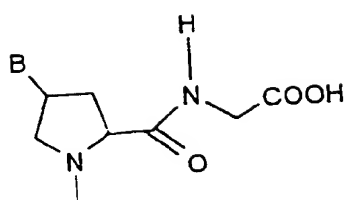
40

Dies ergibt folgende Syntheseäquivalente:

45

50

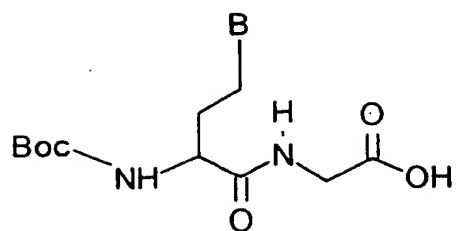
55



50 Im Fall 2-Aminobutyryl-Typs wurden ebenfalls dimere Bausteine zur Oligomerisierung eingesetzt:

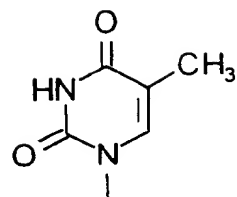
55

5



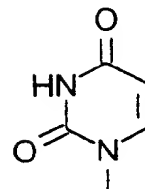
10

B =



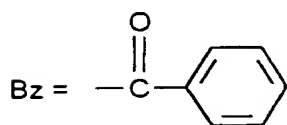
V BocT

15

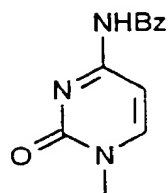


V BocU

20

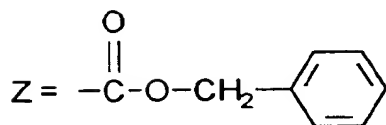


25

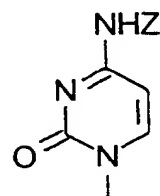


V BocC<sup>Bz</sup>

30

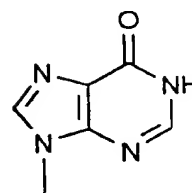


35



V BocC<sup>Z</sup>

40



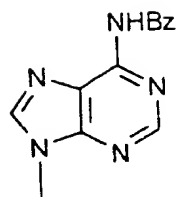
V BocIn

45

50

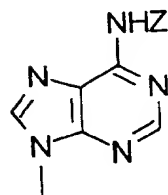
55

5



V BocA<sup>Bz</sup>

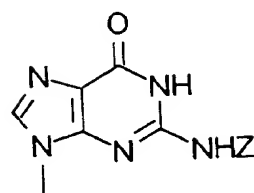
10



V. BocA<sup>Z</sup>

15

20

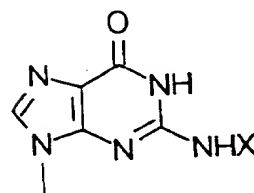
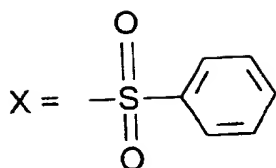


V BocG<sup>Z</sup>

25

30

35



V BocG<sup>X</sup>

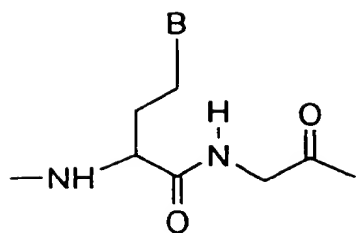
40 Das ergibt folgende 2-Aminobutyrylglycin-Syntheseäquivalente:

45

50

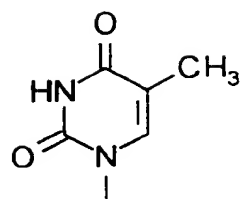
55

5



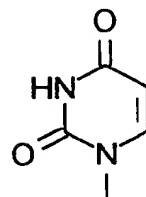
10

B =



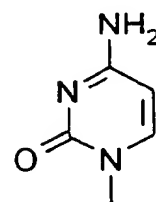
VT

15



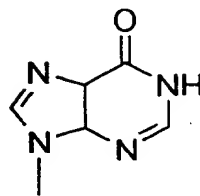
VU

20



VC

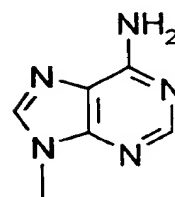
25



VIn

30

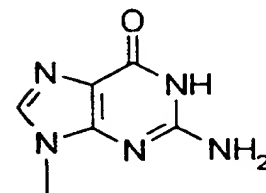
35



VA

40

45



VG

50

55

**Beispiele****Monomere****Beispiel 1**

$\alpha$ -N-Benzoyloxycarbonyl- $\delta$ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (2)

Eine Lösung von  $\alpha$ -N-Benzoyloxycarbonyl- $\delta$ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithin (10,0 g; 27 mmol) in wasserfreiem Methanol (135 ml) wird mit Cäsiumcarbonat auf pH = 9,0 bis 9,5 eingestellt und 30 Minuten bei Raumtemperatur nachgerührt. Anschließend wird eingeeengt und 30 Minuten am Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (135 ml) aufgenommen und mit Jodmethan (4,37 g; 30 mmol) versetzt. Man beläßt 30 Minuten bei Raumtemperatur, engt in vacuo ein und destilliert mehrfach mit Toluol nach. Das entstandene Öl wird in Chloroform (270 ml) aufgenommen und mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet und eingeeengt.  
Ausbeute: 10,4 g (quantitativ).  
Rf: 0,70 Laufmittel: Toluol/EtOH 1:3

**Beispiel 2**

$\delta$ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (3)

Das Produkt aus Beispiel 1 (12,6 g; 33 mmol) wird in Methanol (330 ml) bei Raumtemperatur und Normaldruck 46 h über Palladium auf Bariumsulfat (5 %; 9,96 g) hydriert. Anschließend wird vom Katalysator abgesaugt (Celite) und eingeeengt.  
Ausbeute: 12,6 g (quantitativ).  
Rf: 0,58 Laufmittel: Toluol/EtOH 4:1

**Beispiel 3**

$\delta$ -N-tert.-butyloxycarbonyl- $\alpha$ -N-(thymine-1-yl)acetyl-L-ornithin

Einer Lösung von 1-Carboxymethylthymine (4,22 g; 23 mmol) in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (60 ml) wird eine Lösung von Pentafluorphenol (4,22 g; 23 mmol) in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (20 ml) hinzugefügt. Anschließend wird bei 0 °C N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (4,74 g; 23 mmol), gelöst in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (20 ml), langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 3 h nachgerührt, wobei man auf Raumtemperatur aufwärmen läßt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit N,N-Dimethylformamid nachgewaschen und zur Lösung  $\delta$ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithin (4,45 g; 19 mmol), gelöst in N,N-Dimethylformamid, bei 0 °C zugetropft. Man rührt weitere 21 h bei Raumtemperatur, engt in vacuo ein, destilliert mehrfach mit Toluol nach und chromatographiert an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (2:1) als Laufmittel.  
Ausbeute: 7,70 g (quantitativ)  
Rf: 0,78 Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1

**Beispiel 4**

N<sup>4</sup>-Benzoyl-1-tert.-butyloxycarbonylmethylcytosin

Zu einer Suspension von N<sup>4</sup>-Benzoylcytosin (21,5 g; 0,1 mol) und Kaliumcarbonat (13,8 g; 0,1 mol) in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (2,15 l) wird bei Raumtemperatur langsam Bromessigsäure-tert.-butylester (24 ml; 0,15 mol) zugetropft. Das heterogene Gemisch wird 20 h heftig bei Raumtemperatur verrührt, anschließend von unlöslichen Edukt abgesaugt, in vacuo eingeeengt, mehrfach mit Toluol nachdestilliert, der Rückstand mit Chloroform (1,0 l) aufgenommen, einmal mit Wasser (0,3 l) ausgeschüttelt und zügig die Phasen getrennt. Die organische Phase wird nochmals filtriert und eingeeengt.  
Ausbeute: 15,23 g (46 %).  
Rf: 0,33 Laufmittel Toluol/EtOH 10:1



**Beispiel 5**N<sup>4</sup>-Benzoyl-1-carboxymethylcytosin (4)

- 5 Das Produkt aus Beispiel 4 wird in Trifluoressigsäure (170 ml) gelöst und 1 h 45 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird fünfmal mit Toluol codestilliert und das Produkt 24 h im Exsikkator über Phosphorpentoxid/Kaliumhydroxid getrocknet.  
Ausbeute: 11,8 g (93 %).  
Rf: 0,1 Laufmittel: Toluol/EtOH 1:1

10

**Beispiel 6** $\alpha$ -N-(N<sup>4</sup>-Benzoylcytosin-1-yl)acetyl- $\delta$ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (5)

- 15 N<sup>4</sup>-Benzoyl-1-carboxymethylcytosin (15,76 g; 58 mmol) und  $\delta$ -tert.-Butyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (9,61 g; 39 mmol) werden in wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (520 ml) suspendiert und mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (11,92 g; 58 mmol) versetzt. Das Gemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt, danach in vacuo eingengt und mehrfach mit Toluol nachdestilliert. Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Toluol/Ethanol 8:1).  
20 Ausbeute: 5,21 g (27 %).  
Rf: 0,47 Laufmittel: Toluol/EtOH 4:1

**Beispiel 7**

- 25  $\alpha$ -N-(N<sup>4</sup>-Benzoylcytosin-1-yl)acetyl- $\delta$ -N-tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithin (6)

- Eine Lösung des Produktes aus Beispiel 6 (4,80 g; 8,7 mmol) in Dioxan/Wasser (5:1; 70 ml) wird mit Lithiumhydroxid-Hydrat (440 mg; 10,5 mmol) versetzt und 1,5 h bei Raumtemperatur belassen. Nachfolgend wird mit 0,5 N Salzsäure neutralisiert und eingengt. Das Produkt kristallisiert aus Methanol.  
30 Ausbeute: 2,09 g (45 %).

**Beispiel 8**

N-Boc-L-Homoserin-tert.-butylester (8)

35

- N-Boc-Asparaginsäure-tert.-butylester (15,4 g; 53,1 mmol) wird in abs. THF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird 1 eq. Triethylamin gefolgt von 1 eq. Chlorameisensäureethylester zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 min bei 0 °C und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird vom ausgefallenen Triethylaminhydrochlorid abgesaugt und das Filtrat direkt weiter umgesetzt.  
40 Das Filtrat wird zu einer Suspension von NaBH<sub>4</sub> in THF, die auf 0 °C vorgekühlt ist, getropft und bei dieser Temperatur 15 bis 20 min gerührt. Danach wird das Eisbad entfernt und für weiter 30 bis 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird durch Zugabe an 1N HCl gequenched. Anschließend werden die Phasen getrennt und die organische Phase nacheinander je 3 mal mit 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Zurück bleibt ein klares Öl.  
45 Ausbeute: 12 g (82,2 %).  
Rf: 0,66 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1

**Beispiel 9**

50

N-Boc- $\gamma$ -methansulfonyloxy-L-homoserin-tert.-butylester (9)

- N-Boc-L-Homoserin-tert.-butylester (13 g; 47,2 mmol) wird in abs. Pyridin gelöst und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur werden 1,1 eq. Methansulfonsäurechlorid zugetropft. Anschließend  
55 läßt man 5 h bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das Pyridin abdestilliert. Der Rückstand wird mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander je 3 mal mit 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Essigsäureethylester aufgenommen

und das Produkt durch Zugabe an n-Hexan ausgefällt.  
 Ausbeute: 12,9 g (77 %).  
 Rf: 0,76 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1  
 Smp: 93 °C

5

**Beispiel 10a**

N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (10)

10 N<sup>3</sup>-Benzoyl-thymin (2 eq.) wird in abs. DMF vorgelegt und mit 2 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Mesylat (9) (1,18 g; 3,36 mmol) gelöst in DMF zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird auf 60 °C aufgeheizt und bei dieser Temperatur 4 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander je 3 mal mit 20 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die Essigsäureethylesterphase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne einrotiert. Das erhaltene Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.  
 15 Ausbeute: 897 mg (54,8 %) weißer Schaum.  
 Rf: 0,72 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

**Beispiel 10b**

N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (10)

2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N<sup>3</sup>-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste (8) (3,02 g; 10,98 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Laufmittel chromatographiert.  
 25 Ausbeute: 3,19 g (58,5 %) weißer Schaum.  
 30 Rf: 0,72 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

**Beispiel 11a**

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (11)

35 Verbindung (10) (3,19 g; 5,96 mmol) wird mit NH<sub>3</sub> in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die Abspaltung der Boc- und der OtBu-Schutzgruppe eingesetzt.

**Beispiel 11b**

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester (11)

2 eq. Thymin und 2 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> werden in abs. DMF bei Raumtemperatur 5 min gerührt. Anschließend wird Verbindung (9) (1,18 g; 3,36 mmol) gelöst in abs. DMF zugetropft und 4 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt mit Essigsäureethylester überschichtet. Die organische Phase wird nacheinander je 3 mal mit 20 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockne eingedampft. Schließlich wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1 als Eluent chromatographiert.  
 45 Ausbeute: 650 mg (50 %).  
 50 Rf: 0,53 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1  
 Smp: 184 bis 187 °C

55

**Beispiel 12**

## 4-(Thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure\* TFA

- 5 Verbindung (11) wird in TFA (2 ml pro mmol) 2 h im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene Lösung wird anschließend in abs. Ether pipettiert, wobei das TFA-Salz ausfällt. Das erhaltene TFA-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.  
Ausbeute: quantitativ.

10 **Beispiel 13**

## 4-(Thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure\* HBr

- Verbindung (11) wird in HBr/Essigsäure (5 ml pro mmol) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur  
15 gerührt. Anschließend wird die Lösung in abs. Ether pipettiert, wobei das HBr-Salz ausfällt. Das erhaltene HBr-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.  
Ausbeute quantitativ.  
Smp: > 200 °C Zersetzung

20 **Beispiel 14**

## N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure (12)

- Die Einführung der Boc-Schutzgruppe ausgehend von dem TFA-Salz aus Beispiel 12 erfolgt auf dem  
25 gleichen Weg wie für das HBr-Salz aus Beispiel 13. Exemplarisch wird die Schutzgruppeneinführung ausgehend von dem HBr-Salz beschrieben.

- Das HBr-Salz (10,7 g; 34,7 mmol) wird in THF vorgelegt. Der pH der Lösung wird durch Zugabe an Triethylamin auf pH 8 eingestellt. Danach tropft man 1,1 eq. Di-tert.-butyl-dicarbonat gelöst in THF zu und läßt bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Während der Reaktion wird darauf geachtet, daß der pH-Wert  
30 nicht unter den Wert 8 fällt. Nach beendeter Reaktion wird das THF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und der pH durch Zugabe an 1N HCl auf 1 bis 2 eingestellt. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1 chromatographiert.  
Ausbeute: 6 g (53 %).

- 35 Rf: 0,53 Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 80:20:1  
Smp: 124 °C

**Beispiel 15**

## 40 N-Fmoc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure

- Das TFA-Salz aus Beispiel 12 (3,4 g; 9,66 mmol) wird in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton/Wasser (30 ml : 30 ml) gelöst und mit 2 eq. NaHCO<sub>3</sub> versetzt. Dann gibt man 1 eq. 9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat zu und läßt bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Nach beendeter Reaktion wird  
45 das Aceton abdestilliert, die wäßrige Phase mit Chloroform versetzt und anschließend mit 1N HCl auf pH 2 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt. Die Chloroform-Phase wird schließlich 3 mal mit je 50 ml 0,1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die Phasen werden getrennt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Produkt wird an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel gesäut.  
50 Ausbeute: 2,7 g (55,3 %).  
Rf: 0,80 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 80:20:1

**Beispiel 16**55 N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester

- 2 eq. N<sup>4</sup>-Benzoyl-cytosin und 2 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> werden in abs. DMF 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird Verbindung (9) (13,35 g; 37,8 mmol) gelöst in DMF zugetropft. Die Lösung wird auf 60 °C

- erhitzt und bei dieser Temperatur 4 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander je 3 mal mit 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird schließlich über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 chromatographiert.
- 5 Ausbeute: 6,1 g (35 %).  
Rf: 0,55 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1

**Beispiel 17**

- 10 4-(N<sup>4</sup>-Benzoyl-Cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure\* TFA
- N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-tert.-butylester wird in TFA (2 ml pro mmol) 2 h im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene Lösung wird anschließend in abs. Ether pipettiert, wobei das TFA-Salz ausfällt. Das erhaltene TFA-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.
- 15 Ausbeute: quantitativ.

**Beispiel 18**

- 20 N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure
- Das TFA-Salz (5,5 g; 10,43 mmol) aus Beispiel 17 wird in einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan/Wasser (25 ml : 15 ml) gelöst und mit 3 eq. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt. Die Lösung wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 1,3 eq. Di-tert.-butyl-dicarbonat gelöst in 15 ml Dioxan zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Dioxan abdestilliert, die wäßrige Phase mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 2 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt und die organische Phase nacheinander 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Produkt wird aus Essigsäureethylester/n-Hexan gefällt.
- 25 Ausbeute: 3,65 g (83 %).  
Rf: 0,50 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 80:20:1
- 30

**Beispiel 19**

- 35 N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-Z-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure-tert.-butylester
- N<sup>4</sup>-Z-Cytosin (2 eq.) wird in abs. DMF vorgelegt und mit 2 eq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt. Es wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Mesylat (9) (11 g; 31,1 mmol) gelöst in DMF zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird auf 60 °C aufgeheizt und bei dieser Temperatur 4 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und nacheinander 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Laufmittel chromatographiert.
- 40 Ausbeute: 9 g; (57,6 %).  
Rf: 0,21 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1
- 45

**Beispiel 20**

- 50 4-(N<sup>4</sup>-Z-Cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure\* TFA
- N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-Z-cytosin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-tert.-butylester (9 g; 18,9 mmol) wird in TFA (2 ml pro mmol) 2 h im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene Lösung wird anschließend in abs. Ether pipettiert, wobei das TFA-Salz ausfällt. Das erhaltene TFA-Salz wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum über KOH getrocknet.
- 55 Ausbeute: quantitativ.

**Beispiel 21**N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-Z-cytosin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure

- 5 Das TFA-Salz (6,74 g; 14,6 mmol) aus Beispiel 20 wird in einem Lösungsmittelgemisch aus Dioxan/Wasser (2:1) gelöst und mit 3 eq. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt. Die Lösung wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 1,3 eq. Di-tert.-butyl-dicarbonat gelöst in wenig Dioxan zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Dioxan abdestilliert, die wäßrige Phase mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 2 angesäuert. Danach werden die
- 10 Phasen getrennt und die organische Phase nacheinander 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Produkt wird aus Essigsäureethylester/n-Hexan gefällt.

Ausbeute: 4 g; (61,4 %).

Rf: 0,85 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 80:20:1

- 15 Smp.: 190 °C

**Beispiel 22**2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure-methylester (16)

- 20 2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N<sup>3</sup>-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man den in abs. DMF gelösten 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (1,23 g; 5 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das
- 25 DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 1,2 g (52,5 %).

Rf: 0,40 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

- 30 **Beispiel 23**

2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure-benzylester (15)

- 2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N<sup>3</sup>-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man den in abs. DMF gelösten 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-benzylester (11 g; 34,3 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das
- 35 DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

- 40 Ausbeute: 10,86 g (58,3 %)

Rf: 0,68 Laufmittel Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

**Beispiel 24a**

- 45 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-methylester (5,8 g; 12,7 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1) wird das Isopropanol abdestil-
- 50 liert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt (siehe Beispiel 25).

Rf: 0,60 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1

- 55

**Beispiel 24b**

2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 5 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-benzylester (10,86 g; 20,3 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min mit N<sub>2</sub> gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölpumpe getrocknet.
- 10 Ausbeute: 9,03 g (quantitativ).  
Rf: 0,60 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1

**Beispiel 25**

- 15 2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (17)

2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (9,03 g; 20,3 mmol) wird mit NH<sub>3</sub> in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel gesäult.

- 20 Ausbeute: 3,55 g (51,7 %).  
Rf: 0,33 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 80:20:1  
Smp.: 228 °C

**Beispiel 26**

- 25 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-benzylester

- 2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N<sup>3</sup>-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (7,5 g; 23,36 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

- Ausbeute: 5,6 g (47,2 %).  
35 Rf: 0,56 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

**Beispiel 27**

2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

- 40 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-benzylester (1,9 g; 3,75 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min mit N<sub>2</sub> gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölpumpe getrocknet.
- 45 Ausbeute: 1,51 g (96,8 %).  
Rf: 0,05 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1

**Beispiel 28**

- 50 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester

- 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (5,9 g; 14,2 mmol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf -30 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBt gefolgt von 1,3 eq. EDCI·HCl zu und läßt 10 bis 15 min bei max. -15 °C rühren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von Glycin-benzylester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf -15 °C gekühlten Reaktionslösung getropft. Man läßt 1 h bei max. -10 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird

das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1 chromatographiert.

5 Ausbeute: 4,2 g (51,2 %).

Rf: 0,25 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

### Beispiel 29

10 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin

2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzoyl-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester (3,67 g; 6,38 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min. mit N<sub>2</sub> gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach

15 beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 2,78 g (89,7 %).

### Beispiel 30

20 2S 4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-Z-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-methylester

2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N<sup>4</sup>-Z-Cytosin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur

25 gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (10 g; 40,8 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 15,6 g (81 %).

30 Rf: 0,60 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

### Beispiel 31

35 2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-Z-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

2S,4S-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-Z-cytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-methylester (15,6 g; 33 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1) wird das Isopropanol abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach

40 worden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel chromatographiert.

Ausbeute: 7,27 g (48 %)

Rf: 0,73 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 80:20:1

45

### Beispiel 32

2S,4S-N-Boc-4-(4-Nitro-benzoyloxy)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester (18)

50 2S,4R-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (60,05 g; 269 mmol), 1,2 eq. Triphenylphosphin (85,93 g; 327 mmol) und 1,25 eq. para-Nitrobenzoesäure (56,05 g; 335 mmol) werden in abs. THF unter Schutzgas gelöst. Die erhaltene Lösung wird auf 0°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wird Azodicarbonsäurediethylester gelöst in abs. THF zugeotropft. Anschließend läßt man auf Raumtemperatur auftauhen und für weitere 70 h bei Raumtemperatur rühren. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert und

55 der Rückstand mit Ether behandelt. Von den dabei ausfallenden Nebenprodukten wird abgesaugt, das Filtrat wird einrotiert und das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan (im Verhältnis 2:1) aufgereinigt und schließlich durch Chromatographie an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (im Verhältnis 60:1) endgereinigt.

Ausbeute: 100 g (94,15 %)  
Rf: 0,85 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

**Beispiel 33**

2S,4S-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (19)

2S,4S-N-Boc-4-(4-Nitro-benzoyloxy)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester (11,82 g; 30 mmol) wird in ca. 300 ml abs. MeOH gelöst. Zu dieser Lösung tropft man eine Lösung von Natriummethylat (1,62 g; 30 mmol) in Methanol und läßt 30 min. bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird mit 1N HCl ein pH von 5 eingestellt. Danach wird das Methanol abdestilliert. Die wäßrige Phase wird mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden schließlich mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan (im Verhältnis 2:1) chromatographiert.

Ausbeute: 6,98 g (94,9 %)  
Rf: 0,35 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1

**Beispiel 34**

2S,4R-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-methylester (20)

2,5 eq. Triphenylphosphin und 2,5 eq. DEAD werden in abs. THF gelöst und 5 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das N<sup>3</sup>-Benzoyl-thymin (2 eq.) zugegeben und erneut 5 min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend tropft man das in abs. DMF gelöste 2S,4S-N-Boc-hydroxyprolin-methylester (30 g; 122 mmol) zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert und das Rohprodukt an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 38,0 g (67,9 %)  
Rf: 0,27 Laufmittel: Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1

**Beispiel 35**

2S,4R-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

2S,4R-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-methylester (38 g; 83 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1) wird das Isopropanol abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt (siehe Beispiel 36).

**Beispiel 36**

2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (21)

2S,4R-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure wird mit Ammoniak in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1 als Laufmittel gesäult.

Ausbeute: 12,6 g (44,8 %)  
Rf: 0,25 Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1

**Beispiel 37**

2 S, 4R-N-Boc-N-(N<sup>4</sup>-benzyloxycarbonylcytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester

3,28 g (12,5 mMol) Triphenylphosphin und 2,18 g (12,5 mMol) DEAD werden in 20 ml abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit werden 2,45 g (10 mMol) N<sup>4</sup>-Benzyloxycarbonyl-



cytosin zugegeben und erneut 5 min verrührt. Anschließend tropft man 1,23 g (5 mMol) N-Boc-L-cis-hydroxyprolinmethylester in DMF gelöst zu und läßt bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Das DMF wird abdestilliert und der Rückstand mit Essigsäureethylester versetzt. Nun wird einmal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rück-

5 stand wird an SiO<sub>2</sub> mit Methylenchlorid/Methanol 30:1 als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 840 mg (35 % d.Th.)  
RF: 0,7 Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 30:1

### Beispiel 38

10 2 S, 4R-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-benzyloxycarbonylcytosin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

580 mg (1,2 mmol) 2S,4R-N-Boc-4-(N<sup>4</sup>-Benzyloxycarbonylcytosin-1-yl)pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester werden in 10 ml Dioxan und 2 ml H<sub>2</sub>O gelöst und auf 10 °C gekühlt. Nun werden 1,2 ml (1,2 mmol) 1N NaOH bei 10 °C zugetropft und nach 5 h bei dieser Temperatur nochmals 0,6 ml (0,6 mmol) 1N NaOH. Es

15 wird weitere 2 Stunden bei 10 °C verrührt und über Nacht im Kühlschrank stehen lassen. Die Lösung wird eingeeengt, mit Essigsäureethylester versetzt und einmal mit 1N HCl ausgeschüttelt. Danach wird die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 10:1 als Eluent chromatographiert.

20 Ausbeute: 300 mg (53,0 % d.Th.)  
RF: 0,17 Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 10:1

### Beispiel 39

25 2R, 4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäuremethylester

69,5 (265 mMol) Triphenylphosphin und 46,1 g (265 mmol) DEAD werden in 400 ml abs. THF gelöst und 5 min bei Raumtemperatur verrührt. Nach dieser Zeit werden 48,8 g (212 mMol) N<sup>3</sup>-Benzoyl-thymin zugegeben und erneut 5 min bei Raumtemperatur verrührt. Anschließend tropft man 26,0 g (106 mmol). N-Boc-D-trans-hydroxyprolin-methylester in DMF gelöst zu und läßt über Nacht bei Raumtemperatur verrüh-

30 ren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, abfiltriert und eingeeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 1:1 als Eluent chromatographiert.

35 Ausbeute: 22,58 g (46,5 % d.Th.)  
RF: 0,26 Laufmittel EE/n Hexan 1:1

### Beispiel 40

40 2R,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure

1,18 g (2,5 mMol) 2R, 4S-N-Boc-4-(N<sup>3</sup>-benzoyl-thymin-1-yl)pyrrolidin-2-carboxymethylester werden in 20 ml Isopropanol und 10 ml Dioxan gelöst und auf 3 °C abgekühlt. Dann tropft man 5 ml (5 mMol) 1N NaOH bei 3 °C zu und verrührt 7 Std. bei dieser Temperatur. Anschließend tropft man nochmal 2,5 ml (2,5

45 mmol) 1N NaOH zu und läßt über Nacht im Eisbad stehen. Die Lösung wird eingeeengt und mit Essigsäureethylester und 1N HCl versetzt bis ein pH-Wert von 1 erreicht ist. Nun schüttelt man einmal mit Essigsäureethylester aus, trocknet die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und engt zur Trockne ein. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/HOAc 90:10:1 als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 430 mg (49,1 % d. Th)  
50 RF: 0,23 Laufmittel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH/HOAc 90:10:1

### Beispiel 41

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-glycin-methylester

55 N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobuttersäure (6,0 g; 18,35 mmol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf -30 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBt gefolgt von 1,3 eq. EDCI/HCl zu und läßt 10 bis 15 min. bei maximal -15 °C rühren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von Glycinmethy-

lester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf  $-15^{\circ}\text{C}$  gekühlten Reaktionslösung getropft. Man läßt 1 h bei maximal  $-10^{\circ}\text{C}$  und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges.  $\text{NaHCO}_3$ - und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit Essigsäureethylester/n-Hexan 2:1 chromatographiert.

Ausbeute: 3,9 g (53 %)

Rf: 0,56 Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1

#### Beispiel 42

N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-L-aminobutyryl-glycin (3,9 g; 10,1 mmol) wird in Isopropanol gelöst und mit 1,1 eq. 1N NaOH versetzt. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$  90:10:1) wird das Isopropanol abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert. Danach werden die Phasen getrennt, die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Anschließend wird mit Essigsäureethylester überschichtet und mit 1N HCl angesäuert. Nach Phasentrennung wird die organische Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und dann zur Trockne eingedampft.

Ausbeute: 3,1 g (82 %)

#### Beispiel 43

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-glycin-benzylester

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-2-carbonsäure (5,0 g; 14,7 mmol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf  $-30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBt gefolgt von 1,3 eq. EDCI $\cdot$ HCl zu und läßt 10 bis 15 min. bei maximal  $-15^{\circ}\text{C}$  rühren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von Glycinbenzylester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf  $-15^{\circ}\text{C}$  gekühlten Reaktionslösung getropft. Man läßt 1 h bei maximal  $-10^{\circ}\text{C}$  und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges.  $\text{NaHCO}_3$ - und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird schließlich an Kieselgel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (im Verhältnis 95:5) chromatographiert. Zur weiteren Reinigung wird das schon recht saubere Produkt aus einem Gemisch aus Essigsäureethylester, Ether und n-Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 3,7 g (51,8 %)

Rf: 0,67 Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1

Smp:  $178^{\circ}\text{C}$

#### Beispiel 44

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxy-glycin

2S,4S-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester (3,7 g; 7,61 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min. mit  $\text{N}_2$  gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$  90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 2,7 g (89,5 %)

#### Beispiel 45

2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester

2S,4R-N-Boc-4-(thymin-1-yl)-pyrrolidin-2-carbonsäure (4,65 g; 13,7 mmol) wird in DMF vorgelegt und die Lösung auf  $-30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Bei dieser Temperatur gibt man 1,3 eq. HOBt gefolgt von 1,3 eq. EDCI $\cdot$ HCl zu und läßt 10 bis 15 min. bei max.  $15^{\circ}\text{C}$  rühren. In der Zwischenzeit wird das Hydrochlorid von

Glycinbenzylester (1,2 eq.) in DMF aufgenommen und mit N-Ethylmorpholin neutralisiert. Diese Lösung wird nach der Voraktivierungszeit zu der auf -15 °C gekühlten Reaktionslösung getropft. Man läßt 1 h bei maximal -10 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Nach beendeter Reaktion wird das DMF abdestilliert, der Rückstand mit Essigsäureethylester überschichtet und 3 mal mit je 100 ml 1N HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub>- und ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingedampft.

Ausbeute: 6,7 g (97,6 %)

Rf: 0,56 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1

#### 10 **Beispiel 46**

2S,4R-N-Boc-4-(thymine-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin

2S,4R-N-Boc-4-(thymine-1-yl)-pyrrolidin-2-carboxyl-glycin-benzylester (6,0 g; 12,3 mmol) wird in MeOH gelöst und das Reaktionsgefäß 10 min. mit N<sub>2</sub> gespült. Nach Zugabe von trockenem Katalysator (Pd auf Aktivkohle 10 %) wird in schwachem Wasserstoffstrom bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1) wird vom Katalysator abfiltriert und gründlich nachgewaschen. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 3,7 g (75,8 %)

20 Rf: 0,25 Laufmittel: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/HOAc 90:10:1

#### **Oligomere**

#### **Beispiel 47**

25

Festphasensynthese von H-(IT)<sub>3</sub>-Gly-OH

120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 136 mg (0,34 mmol) IBocT erfolgt durch Umsetzung mit 365 mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 27 mg (29 %)

#### **Beispiel 48**

40

Festphasensynthese von H-(IT)<sub>7</sub>-Gly-OH

120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 136 mg (0,34 mmol) IBocT erfolgt durch Umsetzung mit 365 mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 72 mg (36 %)

55

**Beispiel 49**Festphasensynthese von H-(IT)<sub>15</sub>-Gly-OH

- 5 120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 136 mg (0,34 mmol) IBocT erfolgt durch Umsetzung mit 365 mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten
- 10 Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
- Ausbeute: 80 mg (19 %)
- 15 LDI-MS: 4282 g/mol gefunden, 4279,2 g/mol berechnet  
LDI: Laser Desorption/ionisation

**Beispiel 50**20 Festphasensynthese von H-(IC)<sub>2</sub>-Gly-OH

- 120 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 166 mg (0,34 mmol) IBocC<sup>Bz</sup> erfolgt durch Umsetzung mit
- 25 365 mg (2,7 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppe erfolgt durch Einwirkung
- 30 von konzentrierter Ammoniak-Lösung bei 55 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
- Ausbeute: 7 mg (11 %)
- FAB: Fast Atom Bombardment
- FAB-MS: 605 g/mol gefunden, 605 g/mol berechnet

**Beispiel 51**Festphasensynthese von H-(IIT-Ala)<sub>2</sub>-OH

- 40 125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 164 mg (0,5 mmol) IBocT und 189 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung
- 45 an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.
- Ausbeute: 34 mg (59 %)
- 50 FAB-MS: 578 g/mol gefunden, 578,6 g/mol berechnet

**Beispiel 52**Festphasensynthese von H-(IIT-Ala)<sub>2</sub>-OH

- 55 192 mg (0,1 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Alanin-HMP-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Piperidin abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 218 mg (0,5 mmol) IFmocT und 311 mg (1,0 mmol) N-

(1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonylschutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60 minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 42 mg (76 %)

FAB-MS: 548 g/mol gefunden, 549,0 g/mol berechnet

#### Beispiel 60

Festphasensynthese von H-IVT-IVC-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 198 mg (0,5 mmol) IVBocT und 243 mg (0,5 mmol) IVBocC<sup>Bz</sup> erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 8-stündige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 54 mg (86 %)

ESI-MS: 630 g/mol gefunden, 630,6 g/mol berechnet

ESI: Electron Spray Ionisation

#### Beispiel 61

Festphasensynthese von H-Lys-(IVT)<sub>8</sub>-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 198 mg (0,5 mmol) IVBocT und 415 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-2-chlorbenzyloxycarbonyl-Lysin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60 minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 180 mg (74 %)

ESI-MS: 2442 g/mol gefunden, 2443,3 g/mol berechnet

#### Beispiel 62

Festphasensynthese von H-Lys-IVT-IVC-IVT-IVC-IVC-IVT-IVC-IVT-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 198 mg (0,5 mmol) IVBocT, 243 mg (0,5 mmol) IVBocC<sup>Bz</sup> und 415 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-2-chlorbenzyloxycarbonyl-Lysin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 8 stündige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 83 mg (35 %)

LDI-MS: 2382 g/mol gefunden, 2383,3 g/mol berechnet

**Beispiel 63**

Festphasensynthese von H-Lys-(VT)<sub>8</sub>-Ala-OH

- 125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 115 mg (0,3 mmol) VBocT und 415 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-2-chlorbenzyloxycarbonyl-Lysin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60 minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 °C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril. Ausbeute: 83 mg (35 %)
- LDI-MS: 2347,4 g/mol gefunden, 2347,3 g/mol berechnet

**Nachweis von DNA-Einzelstrangbindung durch Gel-shift-Analysen****Beispiel 64**

- 1 µg Oligonukleotid von entsprechender Basensequenz wird mit Polynukleotidkinase und γ-ATP am 5'-Ende in bekannter Weise in einem Volumen von 10 µl markiert (Sambrook, Fritsch, Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989). Nach der Markierung wird die Probe zur Denaturierung des Enzyms bei 70 °C für 10 min erhitzt und anschließend mit 9 µg nicht markiertem Oligomer vermischt. 1 µl dieses Ansatzes wird mit einer gewünschten Menge zu testendem Nukleinsäurebindenden Oligomer versetzt (1-10 µg) und in einem Volumen von 20 µl 30 min bei 22 °C (Raumtemperatur) inkubiert (Hybridisierung). Danach wird die Probe 30 min auf Eis gestellt. Ein nicht hybridisiertes markiertes Oligomer wird in gleicher Weise behandelt und dient als Kontrolle. Die Proben werden auf ein 15 % Polyacrylamidgel mit 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer aufgetragen. Das Gel und der Puffer wurden im Kühlschrank (8 °C) vorgekühlt, die Elektrophorese wurde über Nacht mit 55 V im Kühlschrank laufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurde ein Autoradiogramm auf AGFA-Film erstellt (Exponierzeiten 1 bis 16 Stunden).

**Nachweis der Strangverdrängung in doppelsträngiger Plasmid-DNA durch Nukleinsäurebindende****Oligomere****Beispiel 65**

- Die Tests werden wie folgt durchgeführt:
- (Die im Beispiel eingesetzte Plasmid-DNA ist nur ein Modell-Substrat im Test. Andere Plasmide, die Poly-Adenin Sequenzbereiche mit definierten Abständen zueinander enthalten, sind ebenfalls verwendbar.)
- Doppelsträngige, zirkuläre Plasmid-DNA von 4880 Basenpaaren Länge, die zwei Poly-Adenin Sequenzbereiche mit mindestens neun aufeinander folgenden Adennukleotiden im Abstand von 1150 Basenpaaren enthält, wird in den hier beschriebenen Tests verwendet.
- Sechs parallel angesetzte Proben (bezeichnet 1-6) enthielten je 1,0 µg ungeschnittene Plasmid-DNA in 14 µl H<sub>2</sub>O. Den Proben 3 bis 6 wurden je 1 µl Lösung von 0,01 µg, 0,1 µg, 1,0 µg und 2,0 µg Nukleinsäurebindendes Oligomer zugesetzt und in geschlossenen Eppendorfreaktionsgefäßen 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden in alle Proben 4 µl Puffer (250 mM Na-Acetat, 1M NaCl, 2,5 % Glycerin, 5 mM ZnCl<sub>2</sub>, pH 4,4), und in die Proben 2 bis 6 je 1 µl S1-Nuclease (*Aspergillus oryzae*, Fa. Boehringer-Mannheim) mit einer Aktivität von 10 U/µl gegeben.
- Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 30 °C wurden die Proben auf Eis gesetzt, 1 µl 0,5 M EDTA und 3 µl Auftragspuffer (50 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau in 40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH: 7,2) zugegeben und ohne Zeitverzug die Proben über 1,2 %-Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die Größe der entstandenen Plasmid-Fragmente im Gel im Vergleich zu einem Molekulargewichtsstandard (1-kb Leiter, Fa. Gibco-BRL, D-7514 Eggenstein) auf dem Transilluminator (264 nm UV-Licht) bestimmt.
- Es zeigte sich, daß in den Proben mit einer Konzentration > 0,1 µg Oligomer (Proben 5 und 6) DNA-Fragmente von 4880 Basenpaaren (Plasmid-Linearisierung), und 3730 sowie 1150 Basenpaaren (sequenz-

Fluorenylmethoxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Piperidin entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige Behandlung mit Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 27 mg (47 %)

### Beispiel 53

Festphasensynthese von H-(IIC-Ala)<sub>2</sub>-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 213 mg (0,5 mmol) IIBocC<sup>Bz</sup> und 189 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Abspaltung der Benzoyl-Schutzgruppe erfolgt durch Einwirkung von 0,4 M wässriger/methanolischer Natronlauge für 16 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 14 mg (26 %)

FAB-MS: 548 g/mol gefunden, 548,5 g/mol berechnet

### Beispiel 54

Festphasensynthese von H-IIT-Ala-(IIT-Gly)<sub>6</sub>-IIT-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 213 mg (0,5 mmol) IIBocT, 189 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin und 175 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 25-minütige Behandlung mit einer Lösung von 200 µl Trifluormethansulfonsäure in 2 ml Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 27 mg (12 %)

LDI-MS: 2178 g/mol gefunden, 2176,1 g/mol berechnet

### Beispiel 55

Festphasensynthese von H-(IIT-Gly-IIT-Asp)<sub>4</sub>-OH

135 mg (0,1 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Asparaginsäure-tert.-Butylester-HMP-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Piperidin abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 100 mg (0,2 mmol) IIFmocT, 297 mg (1,0 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Glycin und 411 mg (1,0 mmol) N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Asparaginsäure-tert.-butylester erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die N-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Piperidin entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige Behandlung mit Trifluoressigsäure. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

Ausbeute: 57 mg (24 %)

LDI-MS: 2379 g/mol gefunden, 2380,2 g/mol berechnet

#### Beispiel 56

##### 5 Festphasensynthese von H-Gly-IIIIT-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 169 mg (0,5 mmol) IIIBocT und 175 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 ° C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

15 Ausbeute: 15 mg (41 %)  
FAB-MS: 367 g/mol gefunden, 367,4 g/mol berechnet

#### Beispiel 57

##### 20 Festphasensynthese von H-IIIIT-Gly-IIIIT-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 169 mg (0,5 mmol) IIIBocT und 175 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Glycin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 60-minütige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 ° C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

30 Ausbeute: 25 mg (43 %)  
FAB-MS: 588 g/mol gefunden, 588,6 g/mol berechnet

#### 35 Beispiel 58

##### Festphasensynthese von H-(IVC)<sub>2</sub>-Ala-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 243 mg (0,5 mmol) IVBocC<sup>Bz</sup> erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg (1,0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in N-Methyl-2-pyrrolidon. Im Anschluß erfolgt die schrittweise Ankopplung an den polymeren Träger. Nach der letzten Kopplung wird die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt durch 8-stündige Behandlung mit einer Lösung von 0,5 ml Anisol in 4,5 ml HF bei 0 ° C. Die Reindarstellung erfolgt durch RP-HPLC an C8 mit einem ansteigenden Gradienten von TFA in Acetonitril.

45 Ausbeute: 33 mg (53 %)  
FAB-MS: 616 g/mol gefunden, 617 g/mol berechnet

50

#### Beispiel 59

##### Festphasensynthese von H-(IIC-Ala)<sub>2</sub>-OH

125 mg (0,1 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin-PAM-Resin werden im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wird vor jedem Kopplungsschritt durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die Aktivierung von jeweils 446 mg (1,0 mmol) IIBocC<sup>Bz</sup> und 139 mg (1,0 mmol) tert.-Butyloxycarbonyl-Alanin erfolgt durch Umsetzung mit 135 mg (1,0 mmol) Hydroxybenzotriazol und 206 mg



selektive Fragmentierung) sichtbar waren.

Mit einem modifizierten Testansatz, bei dem in die Proben anstelle der zirkulären Plasmid-DNA eine Plasmid-DNA gegeben wurde, die durch Restriktionsendonukleaseverdau in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer der beiden Poly-Adenin Sequenzbereiche linearisiert war, waren ebenfalls in den Proben 5 und 6 die DNA-Fragmente von 3730 und 1150 Basenpaaren Länge nachweisbar.

Mit diesen Testreihen war die konzentrationsabhängige und sequenzselektive Bindung von Nukleinsäuren-bindenden Oligomeren an doppelsträngige DNA und der Nachweis der dadurch entstehenden Einzelstrang-DNA durch S1-Nukleaseverdauung bei hohen Salzkonzentrationen (einzelsstrangspezifische Aktivität von S1-Nuklease) nachweisbar.

## Proteinsynthesehemmung in in vitro Translationstesten durch Nukleinsäurebindende Oligomere

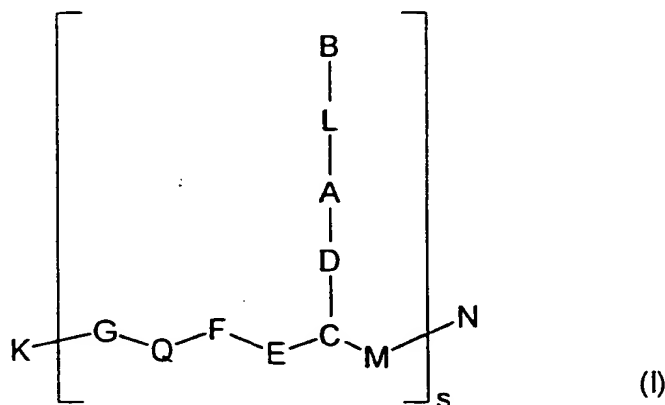
### Beispiel 66

Zur in vitro Translation wurde ein Kaninchenretikulozytenlysat der Fa. Promega, Madison, Wisconsin verwendet, sowie in vitro transkribierte mRNA des tat-Gens aus HIV-I und der Delta-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors aus *Torpedo californica*. Andere Gene können in gleicher Weise verwendet werden. Die cDNA-Konstrukte der Gene wurden mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase in gängiger Weise transkribiert (Sambrook et al., dito), das DNA-Plasmid wurde anschließend durch DNase verdaut, die mRNA phenolisiert und dreimal mit Ethanol gefällt. 1 bis 2 µg der erhaltenen mRNA wurde in Gegenwart von <sup>35</sup>S-markiertem Cystein zur in vitro Translation eingesetzt. Die Analyse des gebildten radioaktiven Proteins erfolgte auf einem 6 bis 18 % bzw. 6 bis 10 % diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

Zur quantitativen Messung der Translationsinhibition durch Nukleinsäure-bindende Oligomere wurde zur mRNA eine gewünschte Menge Oligomer (0,01 bis 2 µg) hinzugegeben und dann wie oben beschrieben in Kaninchenretikulozytenlysat die in vitro Translation durchgeführt. Autoradiographien von SDS-Polyacrylamidelektrophoresegelelen der Testansätze wurden mit einem Scanner quantitativ ausgewertet.

### Patentansprüche

#### 1. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



in der

A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,

B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:

-H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische Modifikation von diesen abgeleitete Derivate sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

- C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 E für -NH-, -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht.  
 A und E miteinander über eine Alkylkette  $[-(CH_2)_n-]$ , mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können,  
 F für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 Q für  $(-CR^1R^2)_m$  mit  $m = 0, 1, 2$  und  $R^1, R^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,  
 G und Q miteinander über eine Alkylkette  $[-(CH_2)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können  
 G für -NH-, -NR-, -O-, -S- steht,  
 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 L für  $(CH_2)_p$  mit  $p = 0, 1, 2$ , -CHR-, -CRR'- steht,  
 K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,  
 N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,  
 s für einen Wert von 1 bis 30 steht und  
 R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

## 2. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:  
 -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,  
 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,  
 D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,  
 A und E miteinander über eine Alkylkette  $[-(CH_2)_n-]$ , mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können,  
 F für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,  
 Q für  $(-CR^1R^2)_m$  mit  $m = 0, 1, 2$  und  $R^1, R^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,  
 G und Q miteinander über eine Alkylkette  $[-(CH_2)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können  
 G für -NH-, -NR-, -O- steht,  
 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -CS- steht,  
 L für  $(CH_2)_p$  mit  $p = 0, 1, 2$ , -CHR-, -CRR'- steht,  
 K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,  
 N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,  
 s für einen Wert von 1 bis 30 steht,  
 R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

## 3. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, in der

- A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,  
 B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:

-H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate der Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

5 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,

E für -NR-, -NH-, -CHR- steht,

A und E miteinander über eine Alkylkette [-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>], mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können,

F für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -CS- steht,

10 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro-α-aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

G und Q miteinander über eine Alkylkette [-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können

G für -NH-, -NR-, -O- steht,

20 M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -CS- steht,

L für (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> mit p = 0, 1, 2, -CHR-, -CRR'- steht,

K für Carrier-System, Reporter-Ligand, H, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

N für Carrier-System, Reporter-Ligand, OH, löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

s für einen Wert von 1 bis 30 steht,

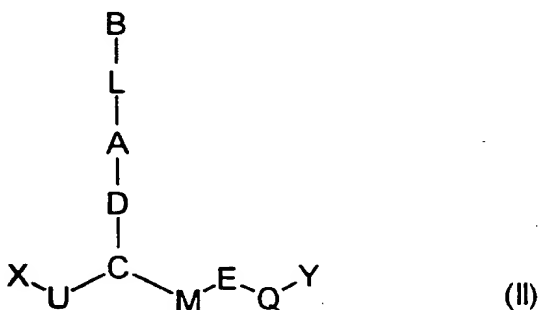
25 H und R<sup>1</sup> für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

#### 4. Verbindungen der allgemeinen Formel (II)

30

35

40



in der

45 A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

50 C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,

E für -NH-, -NR-, -CHR-, -CRR'-, -O-, -S- steht,

55 Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren

wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette  $[(-CH_2-)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können

M für  $-CH_2-$ ,  $-CO-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO-$ ,  $-CS-$  steht,

L für  $(CH_2)_p$  mit  $p = 0, 1, 2$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

U für  $-NH-$ ,  $-NR-$  steht,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht und

Y für  $COOH$ ,  $CSOH$ ,  $CH_2OH$ ,  $COOR''$  mit  $R'' =$  beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

#### 5. Verbindungen der Formel (II) gemäß Anspruch 4, in der

A für  $-CO-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:  $-H$ ,  $-OH$ ,  $(C_1-C_4)$ -Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

C für  $-CH-$ ,  $-CR-$  steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für  $-NH-$ ,  $-CH_2-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

E für  $-NR-$ ,  $-NH-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$ ,  $-O-$  steht,

Q für  $(-CR^1R^2-)_m$  mit  $m = 0, 1, 2$  und  $R^1$ ,  $R^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin; Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette  $[(-CH_2-)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können

M für  $-CH_2-$ ,  $-CO-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO-$ ,  $-CS-$  steht,

L für  $(CH_2)_p$  mit  $p = 0, 1, 2$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

U für  $-NH-$ ,  $-NR-$  steht,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht und

Y für  $COOH$ ,  $CSOH$ ,  $CH_2OH$ ,  $COOR''$  mit  $R'' =$  beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

#### 6. Verbindungen der allgemeinen Formel (II) gemäß Anspruch 4, in der

A für  $-CO-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:  $-H$ ,  $-OH$ ,  $(C_1-C_4)$ -Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

C für  $-CH-$ ,  $-CR-$  steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für  $-NH-$ ,  $-CH_2-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

E für  $-NR-$ ,  $-NH-$ ,  $-CHR-$ ,  $-O-$  steht,

Q für  $(-CR^1R^2-)_m$  mit  $m = 0, 1, 2$  und  $R^1$ ,  $R^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin,

Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette  $[(-CH_2-)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können

M für  $-CH_2-$ ,  $-CO-$ ,  $-CS-$  steht,

L für  $(CH_2)_p$  mit  $p = 0, 1, 2$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

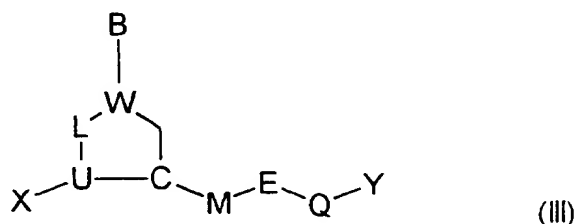
U für  $-NH-$ ,  $-NR-$  steht,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht

Y für  $COOH$ ,  $CSOH$ ,  $CH_2OH$ ,  $COOR''$  mit  $R'' =$  beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht.

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

## 7. Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



in der

A für  $-CO-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus:  $-H$ ,  $-OH$ ,  $(C_1-C_4)$ -Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin oder durch chemische Modifikation von diesen abgeleiteten Derivaten, sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

C für  $-CH-$ ,  $-CR-$  steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für  $-NH-$ ,  $CH_2-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$  steht,

E für  $-NR-$ ,  $-CHR-$ ,  $-CRR'-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$  steht,

Q für  $(-CR^1R^2)_m$  mit  $m = 0, 1, 2$  und  $R^1$ ,  $R^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro- $\alpha$ -aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 2-, 3- oder 4-Aminophenylalanin, 3,4-Dichlorphenylalanin, 4-Jodphenylalanin, 4-Methoxyphenylalanin, 1-Triazolylalanin, 2-Pyridylalanin, 3-Pyridylalanin, 4-Pyridylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht;

E und Q miteinander über eine Alkylkette  $[(-CH_2-)_n]$  mit  $n = 0, 1, 2$  verbunden sein können

M für  $-CH_2-$ ,  $-CO-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO-$ ,  $-CS-$  steht,

U für  $-NH-$ ,  $-NR-$  steht,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,

Y für  $COOH$ ,  $CSOH$ ,  $CH_2OH$ ,  $COOR''$  mit  $R'' =$  beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

8. Verbindungen der Formel (III) gemäß Anspruch 7, in der

A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht,

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen, sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,

E für -NR-, -NH-, -CHR-, -CRR'-, -O- steht,

Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro-α-aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, 4-Nitrophenylalanin, 3-Nitrophenylalanin, 2-Nitrophenylalanin, 1-Naphthylalanin oder 2-Naphthylalanin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub> mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können

M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO-, -CS- steht,

U für -NH-, -NR- steht,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,

Y für COOH, CSOH, CH<sub>2</sub>OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

9. Verbindungen der Formel (III) gemäß Anspruch 7, in der

A für -CO-, -CHR-, -CRR'- steht

B unabhängig voneinander gewählt wird aus einer Gruppe, bestehend aus: -H, -OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkanoyl, DNA-Interkalatoren, aromatischen Resten, heterocyclischen Resten, natürlich vorkommenden Nukleobasen wie Thymin, Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Inosin sowie halogenierten Vorstufen dieser Nukleobasen sowie geschützte Derivate dieser Nukleobasen mit den in der Nukleotid- oder Peptidchemie üblichen Schutzgruppen,

C für -CH-, -CR- steht, wobei C einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

D für -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CHR-, -CRR'- steht,

E für -NR-, -NH-, -CHR-, -O- steht,

Q für (-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>m</sub> mit m = 0, 1, 2 und R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Resten von natürlichen oder unnatürlichen Aminosäuren wie z.B. aus: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan, Lysin, Ornithin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin, Prolin, Hydroxyprolin, Sarcosin, Aminoisobuttersäure, Dehydroaminosäuren wie z.B. Dehydroalanin, Dehydro-α-aminobuttersäure, andere unnatürliche Aminosäuren wie Phenylglycin, gegebenenfalls mit Schutzgruppen, stereochemisch einheitlich in der L-Form oder der D-Form steht,

E und Q miteinander über eine Alkylkette [(-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub> mit n = 0, 1, 2] verbunden sein können

M für -CH<sub>2</sub>-, -CO-, -CS- steht,

U für -NH-, -NR-,

X für eine beliebige aus der Peptidchemie bekannte Schutzgruppe, H oder eine beliebige natürliche oder unnatürliche Aminosäure in geschützter oder ungeschützter Form steht,

Y für COOH, CSOH, CH<sub>2</sub>OH, COOR'' mit R'' = beliebige Schutzgruppe aus der Peptidchemie, Carrier, Reporter-Ligand, Löslichkeitsvermittelnde Gruppe steht,

W für ein chirales C-Atom steht, welches einheitlich S oder R konfiguriert sein kann,

R und R' für H, OH, Alkyl, Aralkyl oder Aryl stehen.

**10. Arzneimittel enthaltend eine oder mehrere Verbindungen aus den Ansprüchen 1 bis 9.**

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 94113573.3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch
A	EP - A - 0 300 796 (SYNTEX (U.S.A.) INC) * Ansprüche 1-3 *	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 113, Nr. 21, 19. November 1990, Columbus, Ohio, USA P. WESTERMANN et al. "Preparation of oligodoxy- ribonucleotide-based affinity carriers" Seite 776, Nr. 191 856t; & DD-A-273 444	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 94, Nr. 5, 2. Februar 1981, Columbus, Ohio, USA S.A. STREL'TSOV et al. "Specific interaction between oligovaline and nucleic acids Seite 185, Nr. 26 354j; & Biofizika 11980, 25(5), 929-41	1-10
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort WIEN	Abschlußdatum der Recherche 11-11-1994	Prüfer BRUS
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschrittliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, überein- stimmendes Dokument		

EP Form 1503 03/82